

アブラナ科植物の  
花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の  
優劣性制御機構の解明

安田 晋輔  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 細胞間情報学研究室  
(高山 誠司 教授)

平成28年8月10日提出

## 目次

序論	-3-
第1章 <i>Brassica rapa</i> Class-II <i>S</i> ハプロタイプ間に見られる直線的な 優劣性制御機構の解明	
1-1 序	-10-
1-2 材料及び方法	-11-
1-3 結果	-16-
1-4 考察	-22-
第2章 <i>Arabidopsis lyrata</i> に見られる優劣性制御機構の解明	
2-1 序	-37-
2-2 材料及び方法	-38-
2-3 結果	-40-
2-4 考察	-44-
第3章 <i>Smi</i> を介した強力な遺伝子発現抑制機構の解明	
3-1 序	-57-
3-2 材料及び方法	-59-
3-3 結果	-63-
3-4 考察	-66-
総括	-78-
謝辞	-81-
参考文献	-83-

## 序論

多くの生物は、有性生殖を行うことで、遺伝的多様性を維持し、近親交配による近交弱勢を回避している。有性生殖により生じた個体は、両親から1組ずつ遺伝子セットを受け継ぐために、両親の形質を併せ持つことが期待されるが、どちらか一方の形質のみが現れる場合が多く見られる。これはメンデルの遺伝の法則のうち「優性の法則」として知られている現象であり (Mendel, 1866)、両親から受け継いだ優性対立遺伝子と劣性対立遺伝子がヘテロの状態になった時に、優性の遺伝子の形質のみが現れるというものである。

これまで、この優劣性現象の機構に関しては、一般的に優性側の対立遺伝子が機能的なタンパク質をコードしているのに対して、劣性側の対立遺伝子はトランスポゾン挿入等によりその機能が失われた結果、優性対立遺伝子由来の表現型のみが現れる例がよく知られていた。例えば、メンデルが扱っていたエンドウ種子の形質において、丸型はしわ型に対し優性であるが、丸型形質を司る対立遺伝子 (R) は SBEI というデンプンの分岐酵素をコードしており、劣性対立遺伝子 (r) はトランスポゾン挿入により機能を失っていることが明らかとなっている (Bhattacharyya *et al.*, 1990)。rr ホモ個体では分岐デンプンが作られないためにスクロース濃度が上昇し、浸透圧が上昇するため、水を多く吸収し、乾燥後しわになる。一方で丸型系統 (RR) としわ型系統 (rr) の親から生まれた個体では遺伝子型が Rr となり、優性 R 対立遺伝子が機能して分岐デンプンを生成するため、丸型の形質を示す。しかしながら、この劣性対立遺伝子の機能欠損とは異なる機構による優劣性現象が、アブラナ科植物の自家不和合性に関わる対立遺伝子間で見出された (Shiba and Takayama, 2012)。これは、優性・劣性対立遺伝子が共に機能的なタンパク質をコードしているにも関わらず、ヘテロ個体において優性の形質のみが現れるものである (Shiba and Takayama, 2012)。

自家不和合性とは自己の花粉を拒絶し、非自己の花粉を受け入れることで自殖を妨げ、他殖を促進する性質のことであり、多くの被子植物がこの自家不和合性と呼ばれる仕組みを備えている (Takayama and Isogai, 2005)。自家不和合性植物では、花粉が柱頭に付着して

から受精するまでの間に自己と非自己の識別がなされ、それにより自己の花粉の吸水反応や花粉管伸長を阻害することで自家受精が回避される。この自己・非自己の自他識別の分子機構は *S* と呼ばれる 1 つの遺伝子座上に存在する花粉側の表現型を決定する因子（花粉側因子）と、めしべ側の表現型を決定する因子（雌ずい側因子）によって制御されている（Takayama and Isogai, 2005）。両因子は互いに密接に連鎖しており、1 つのユニットとして遺伝するため、この花粉側因子、雌ずい側因子の遺伝子ユニットを *S* ハプロタイプと呼んでいる。両因子は多型性を示し、これらの *S* ハプロタイプ特異的な相互作用を介して自家不和合反応が誘起され、受精が拒否される（Takayama and Isogai, 2005）。

自家不和合性の様式は、配偶体型自家不和合性と孢子体型自家不和合性の 2 つに分けられる。配偶体型自家不和合性は、配偶体 ( $n$ ) である花粉の遺伝子型によって花粉側の自家不和合性表現型が決定するという様式であり、一方、孢子体型自家不和合性は、花粉の表現型が花粉親である孢子体 ( $2n$ ) の遺伝子型により決定される様式である。配偶体型自家不和合性はナス科、バラ科、ケシ科等で見られ、孢子体型自家不和合性にはキク科、ヒルガオ科の植物等や本論文で扱うアブラナ科植物が分類される（Takayama and Isogai, 2005）。

アブラナ科植物にはカブやハクサイ (*Brassica rapa*)、キャベツやブロッコリー (*Brassica oleracea*) などが含まれており、自家不和合性を利用した F1 ハイブリッド品種の生産が商業的に行われている。本論文で扱う *B. rapa* には遺伝学的解析から 100 種類以上の *S* ハプロタイプが存在すると推定されている（Nou *et al.*, 1993）。アブラナ科植物の *S* ハプロタイプは花粉側因子としてシステイン残基に富む低分子タンパク質 *SP11/SCR* リガンド (*S* locus protein 11/*S* locus cysteine rich) (Suzuki *et al.*, 1999; Schopher *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000)、雌ずい側因子として膜貫通型受容体キナーゼ *SRK* (*S* receptor kinase) (Stein *et al.*, 1991; Takasaki *et al.*, 2000) をコードしていることが明らかとされている。*SP11* および *SRK* 両遺伝子は *S* ハプロタイプ間で多型性を示しており、同一 *S* ハプロタイプに由来する両者が特異的に相互作用することで不和合反応を誘起する。一方で、*SP11* と *SRK* が異なった *S* ハプロタイプに由来

する場合は、不和合反応が引き起こされず、花粉の吸水反応が誘起され、受精に至る。この SP11 リガンドと SRK 受容体の *S* ハプロタイプ特異的な相互作用によりアブラナ科植物の自家不和合性反応が引き起こされることが明らかとなっている (Kachroo *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2001)。

孢子体型自家不和合性に分類されるアブラナ科植物では、SP11 は孢子体 (2n) である葯のタペート組織で生産され、その後、花粉の成熟に伴って花粉の表層へ移行する。自家不和合性植物では異なる *S* ハプロタイプを持つ花粉と雌ずいの間で受精が起きるため、自然界に存在する個体は全て 2 種類の *S* ハプロタイプを持つヘテロ個体となり、それらの個体は 2 種類の SP11 を持った花粉を生産する。例えば  $S_1S_2$  ヘテロ個体の花粉表層には  $S_1$ -SP11 と  $S_2$ -SP11 が存在するため、 $S_1$ 、 $S_2$  ハプロタイプのいずれかを持つ個体の雌ずいに対して不和合となる。同様に雌ずい因子 SRK は雌ずい先端の乳頭細胞 (2n) で発現されるため、 $S_1S_2$  ヘテロ個体の雌ずいには  $S_1$ -SRK と  $S_2$ -SRK が存在することから、 $S_1$ 、 $S_2$  ハプロタイプのいずれかをもつ花粉が受粉した場合に自家不和合反応が起きる。このように、通常 2 種類の *S* ハプロタイプを持つヘテロ個体では、花粉側・雌ずい側共に 2 種類の *S* ハプロタイプの性質を示すが、特定の *S* ハプロタイプの組み合わせによっては片方の *S* ハプロタイプの性質しか示さない優劣性の関係が生じる場合があることが示されてきた (Hatakeyama *et al.*, 1998)。このような *S* ハプロタイプ間における優劣性機構は、片方の *S* ハプロタイプの性質が表現型として現れなくなる結果、近親交配の機会を招く一方で、氷河期など各個体が隔離され交配相手が減少した際には有利に作用したと推察される (Llaurens *et al.*, 2009)。

このアブラナ科植物の自家不和合性機構では、各 *S* ハプロタイプのホモ個体においても自家不和合性形質を示すことから、全ての *S* ハプロタイプは機能を持つ SP11 と SRK をコードしていると考えられる (柿崎, 2006)。しかし、優性対立遺伝子の影響で劣性対立遺伝子の機能が隠されるため、従来までの劣性対立遺伝子が機能を失っている優劣性機構とは全く別の機構が予想された。

雌ずい側自家不和合性形質の優劣性現象のメカニズムに関しては畠山らによって解析が行われた (Hatakeyama *et al.*, 2001)。*B. rapa*

の  $S_8$ 、 $S_9$ ハプロタイプ間では優劣性の関係が見られ、 $S_8S_9$ ヘテロ個体の雌ずいでは  $S_8$ ハプロタイプの性質が抑制される。また、 $S_8S_8$ ホモ個体に  $S_9$ -*SRK* 遺伝子を導入すると内在性の  $S_8$ -*SRK* は発現しているにもかかわらず  $S_9$ ハプロタイプにより  $S_8$ -*SRK* の機能がマスクされる。このように、雌ずい側自家不和合性形質の優劣性に関しては雌ずい側因子 *SRK* の転写レベルによる制御ではないことが示唆されたが (Hatakeyama *et al.*, 2001)、制御機構の詳細については未解明のままである。

一方、本論文で扱う花粉側自家不和合性形質の優劣性現象に関しては、雌ずい側で確認されたよりも多くの優劣性関係が確認されている (Hatakeyama *et al.*, 1998)。*B. rapa* の多数の *S*ハプロタイプ間の花粉表現型における優劣性関係が調べられた結果、主に優性を示す Class-I ( $S_8$ 、 $S_9$ 、 $S_{12}$ 、 $S_{52}$ ) と劣性を示す Class-II ( $S_{44}$ 、 $S_{60}$ 、 $S_{40}$ 、 $S_{29}$ ) に大きく分類されることが明らかとなった (Hatakeyama *et al.*, 1998)。主に Class-I *S*ハプロタイプの間では共優性を示しており、興味深いことに Class-II *S*ハプロタイプ間においてはさらに直線的な優劣性 ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) が確認されている (Hatakeyama *et al.*, 1998; Kakizaki *et al.*, 2003)。

そこで、これら *B. rapa* における花粉側自家不和合性形質の優劣性現象の分子メカニズムの解明が行われてきた。劣性 Class-II *S*ハプロタイプの花粉因子 *SP11* は Class-II ホモ個体では葯タペート組織で発現しているが、Class-I *S*ハプロタイプとのヘテロ個体ではその発現が数万分の 1 にまで強く抑制されていた (Shiba *et al.*, 2002, 2006)。また優劣性が生じる Class-II 間のヘテロ個体においても、全ての組み合わせにおいて劣性となる *S*ハプロタイプの *SP11* の発現が抑制されていることも明らかとなっている (Kakizaki *et al.*, 2003)。このことから、花粉側自家不和合性形質の優劣性現象は花粉因子 *SP11* の転写制御によって引き起こされていることが示されている。

本優劣性現象における *SP11* 対立遺伝子の転写制御にエピジェネティックな制御機構の関与を疑い、*SP11* 遺伝子領域の DNA メチル化が解析され、Class-I/Class-II ヘテロ個体、および優劣性が生じる Class-II/Class-II ヘテロ個体において、劣性側の Class-II *SP11* プロ

モーター領域特異的に DNA のメチル化が確認されている (Shiba *et al.*, 2006)。この優性 *S* ハプロタイプ共存下で特異的に見られる DNA メチル化は Class-II *SP11* プロモーター領域付近でのみ観察され、*SP11* 遺伝子の約 6.5 kb 上流に存在する *SRK* 遺伝子領域では確認されていない (Shiba *et al.*, 2006)。また本 DNA メチル化はタペート組織のみで観察され、Class-II *SP11* 遺伝子の発現が始まる以前に引き起こされている (Shiba *et al.*, 2006)。以上のように、劣性 *SP11* 対立遺伝子の発現抑制は DNA のメチル化によりエピジェネティックに制御されていることが示されてきた。

さらに本 DNA メチル化を誘導する機構として、本研究室ではこれまでに Class-I/Class-II 間における *SP11* のエピジェネティックな発現抑制が 24 塩基の低分子 RNA である *Smi* (*SP11* methylation inducer) によって引き起こされることを明らかにしてきた (Tarutani *et al.*, 2010)。*Smi* は Class-I *SP11* 近傍領域の逆位反復配列 *SMI* (*SP11* methylation inducing region) から生産され、Class-II *SP11* プロモーターと 19 塩基中 18 塩基以上の高い相同性を示すことで DNA のメチル化を引き起こすことが強く示唆されている。興味深いことに Class-II *S* ハプロタイプにも *Smi* が見つかったが、Class-II *Smi* は Class-I *Smi* と比較して 10 番目の塩基が U から A に置換しており、Class-II *SP11* プロモーターに対する相同性が 19 塩基中 17 塩基に低下しているため、Class-II *SP11* の発現抑制を引き起こすことは出来なかった (Tarutani *et al.*, 2010)。以上のことより、*B. rapa* の花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の優劣性制御はこれまでの劣性対立遺伝子が機能を失っている機構とは全く異なり、低分子 RNA を介したエピジェネティックな機構により制御されていることが示されている (Fig. 1)。

前述のとおり、*B. rapa* の Class-I/Class-II 間における優劣性が 24 塩基の低分子 RNA である *Smi* によってエピジェネティックに制御されていることが明らかとなったが、Class-II 間に見られる直線的な優劣性 ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) に関しては *Smi* で説明することは出来ず、制御機構は未解明のままであった。同様な花粉因子間の優劣性関係は *B. rapa* のみならず *Arabidopsis lyrata*、*Arabidopsis halleri* 等の他のアブラナ科植物やヒルガオ科植物などの自家不和合性植物にも

見られる (Prigoda *et al.*, 2005; Llaurens *et al.*, 2008; Kowiyama *et al.*, 1994)。また、花粉因子以外においても複対立遺伝子間の優劣性は、蝶の擬態遺伝子等 (Joron *et al.*, 2006)、動植物において広く認められるが、これらの現象にエピジェネティックな機構が関与しているかどうかは不明である。また、本機構において *Smi* は標的である Class-II *SP11* 対立遺伝子の発現を数万分の 1 にまで強く抑制することができるが、これほどまでに強力な発現抑制の例は他に無く、この抑制機構の詳細は不明であった。

そこで本論文では低分子 RNA を介したエピジェネティックな優劣性制御機構の普遍性の検討および、その強力な遺伝子発現抑制の詳細な機構解明を目的として以下の研究を行った。

第 1 章では *B. rapa* の Class-II 間に見られる直線的な優劣性 ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) においても同様に低分子 RNA を介したエピジェネティック機構の関与を検討した。その結果、Class-II 間における直線的な優劣性がたった 1 つの低分子 RNA *Smi2* によって制御されることを明らかにした。また、*B. rapa* における複雑な優劣性が僅か 2 つの低分子 RNA により制御されていることから、低分子 RNA とその標的における多型性の獲得により複雑な優劣性関係が進化しうるという新たな進化モデルが予想された。

第 2 章では *B. rapa* の近縁種である *A. lyrata* でみられる優劣性 [Class-IV ( $S_{39}, S_{20}, S_{50}$ ) > Class-III ( $S_{13}, S_{16}$ ) > Class-II ( $S_{18}, S_{14}$ ) > Class-I ( $S_1$ )] について解析を進め、*B. rapa* と同様に数少ない低分子 RNA とその標的の相同性依存的に複雑な優劣性が制御される可能性を見出し、アブラナ科植物において低分子 RNA を介したエピジェネティック機構による優劣性制御の普遍性が示唆された。

第 3 章では *Smi* による強力な Class-II *SP11* 対立遺伝子発現抑制の詳細なメカニズムを解明することを目的とし、Class-II *SP11* プロモーター領域近傍の解析を行った。その結果、Class-II *SP11* の約 1.2 kb 上流に存在する繰り返し配列 (REP) を含むゲノム領域のエピジェネティックな変化が Class-II *SP11* 対立遺伝子の強い発現抑制に関与していることを明らかにした。



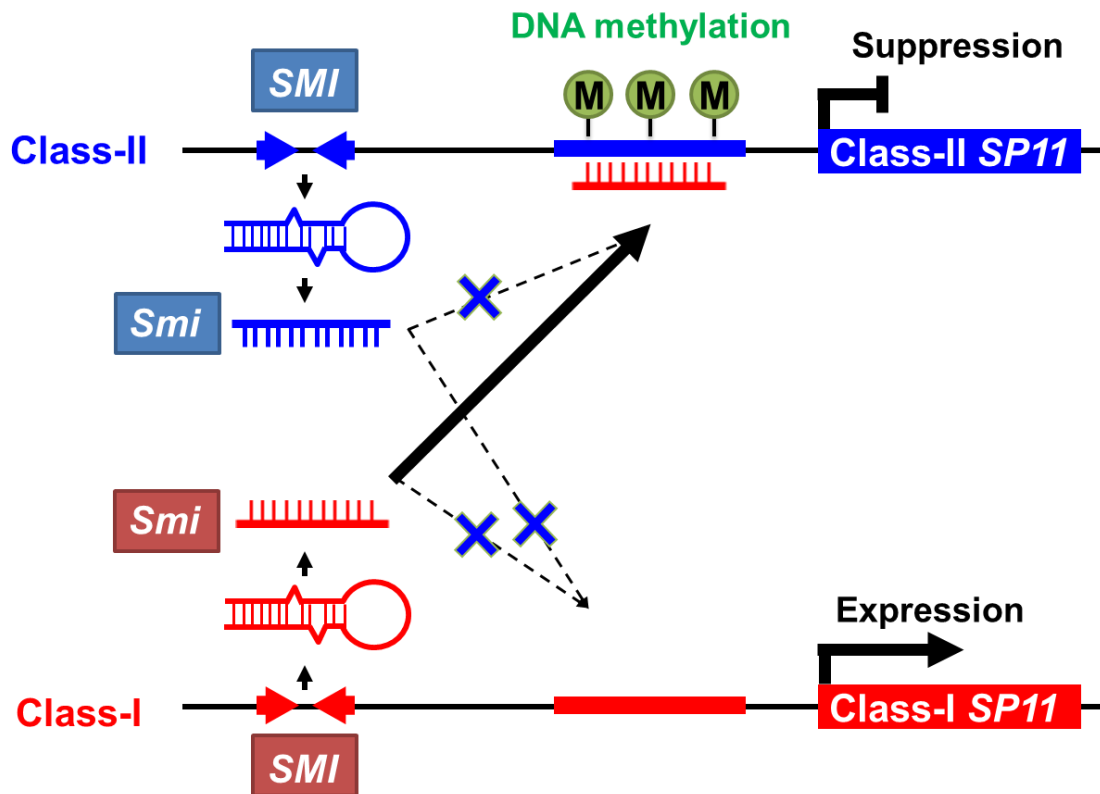


Fig. 1 *B. rapa* における花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の優劣性制御モデル

Class-I (優性) *SP11* 対立遺伝子の近傍に存在する逆位反復配列 *SMI* から 24 塩基の低分子 RNA である *Smi* が生産される。*Smi* は Class-II (劣性) *SP11* プロモーターと高い相同性を示しており、DNA のメチル化と Class-II *SP11* 対立遺伝子の発現抑制を誘導する。一方で、Class-II *SP11* 対立遺伝子の近傍にも *SMI* 領域は存在するが、そこから生産される *Smi* は Class-I *Smi* と比較して 10 番目の塩基が異なっており、自己の *SP11* プロモーターとの相同性が低下しているため DNA のメチル化を誘導することは出来ない (Tarutani *et al.*, 2010)。

# 第1章 *Brassica rapa* Class-II *S*ハプロタイプ間に見られる直線的な優劣性制御機構の解明

## 1-1 序

序論で述べたように、本研究室ではこれまでに *B. rapa* における花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の優劣性が 24 塩基の低分子 RNA (*Smi*) によって制御されていることを報告してきた (Tarutani *et al.*, 2010)。*B. rapa* では Class-II 間においても直線的な優劣性 ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) が認められているが (Kakizaki *et al.*, 2003)、*Smi* には Class-II 間で多型性が無いため、Class-II 間の優劣性を説明することは出来なかった。そこで Class-II 間にみられる直線的な優劣性を制御する因子の探索が本研究グループで行われてきた。Class-II 間の優劣性にも Class-I/Class-II 間の優劣性と同様に低分子 RNA による制御を予測し、*S*<sub>60</sub>ハプロタイプのゲノム配列から *SP11* プロモーターと相同性の高い逆位反復配列の探索が行われ、新たな逆位反復配列である *SMI2* (*SP11 METHYLATION INDUCER2*) の存在が見出されていた (柿崎, 2006; 日置, 2013; 下田, 2014; 樽谷・三浦, 未発表)。Class-II *S*ハプロタイプの葯における超並列シーケンサー解析より、*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>ハプロタイプから 24 塩基の *Smi2* の生産が確認され、各 *Smi2* は自己よりも劣性 *S*ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対してのみ高い相同性を示しており (樽谷・三浦, 未発表)、Class-II 間の優劣性を制御する因子であることが強く示唆されていた。自己の *SP11* プロモーターに対して高い相同性を示す最劣性の *S*<sub>29</sub>-*Smi2* は検出されなかったが、*S*<sub>60</sub>-*Smi2* においても 2 リードしか検出されなかったため、本当に *S*<sub>29</sub>-*Smi2* が生産されていないかを確認する必要があった。また、Class-II *S*ハプロタイプのゲノム情報は一部に限られており、他の候補因子の存在を否定することはできなかった。

そこで本章では、Class-II *S* 遺伝子座の配列決定及び Class-II 間の優劣性を制御する候補として見出された *Smi2* が機能的であるかの検証を行い、*B. rapa* Class-II 間の直線的な優劣性制御メカニズムの解明を試みた。

## 1-2 材料及び方法

### 実験材料

本研究で用いた化学薬品は特に記載のない場合、和光純薬製もしくはナカライテスク製の特級試薬、遺伝子工学用試薬は TaKaRa のものを用いた。

### 植物材料

本研究では植物材料として、本学で栽培・維持されている自家不和合性 *B. rapa*  $S_{44}S_{44}$  ホモ系統、 $S_{60}S_{60}$  ホモ系統、 $S_{40}S_{40}$  ホモ系統、 $S_{29}S_{29}$  ホモ系統、 $S_{60}S_{40}$  ヘテロ個体、 $S_{60}S_{29}$  ヘテロ個体を用い、23°C、14 時間明期、10 時間暗期の条件下、もしくは通常の温室栽培条件で栽培した。

### Class-II *S* ハプロタイプのゲノム配列の決定

$S_{60}$  ハプロタイプに関しては *SP11*、*SRK*、*SLG* を含む 86.4 kb のゲノム配列が報告されているが、*SP11* の下流から、*S* ハプロタイプ間で相同性の高い *S* 遺伝子座近傍領域 (*S*-flanking region 1) (Fukai *et al.*, 2003) までのゲノム領域は分かっていない。*SP11* の下流から *S*-flanking region 1 までのゲノム領域は、Class-I  $S_{46}$  ハプロタイプの *S*-flanking region 1 (Kimura *et al.*, 2002) を基に作成した S46 *S*-flanking F プライマー (Table S1) と  $S_{60}$ -*SP11* の下流の配列を基にして作成した S60 *SP11* downstream R プライマー (Table S1) を用い、 $S_{60}S_{60}$  ホモ個体のゲノム DNA を鋳型として PCR 増幅した。

$S_{44}$ 、 $S_{40}$  ハプロタイプに関しては *SP11* から *SRK* の一部配列を含む 14.0 kb、15.0 kb の配列が報告されている (Kakizaki *et al.*, 2006)。

$S_{44}$ -*SP11* の下流から *S*-flanking region 1 までのゲノム領域に関しては、まず Universal GenomeWalker™ 2.0 (Clontech) を用い、部分的な  $S_{44}$ -*SP11* の下流の配列のクローニングを行った。得られた  $S_{44}$ -*SP11* 下流ゲノム配列を基に作成した S44 *SP11* downstream R プライマーと Class-I  $S_{46}$  ハプロタイプの *S*-flanking region 1 を基に作

成した S46 S-flanking F プライマーを用い、PCR 増幅を行った。

*S*<sub>40</sub>-*SP11* の下流から *S*-flanking region 1 までのゲノム領域は S46 S-flanking F プライマー (Table S1) と *S*<sub>40</sub>-*SP11* の下流の配列を基にして作成した S40 SP11 downstream R プライマー (Table S1) を用い PCR 増幅した。

*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub>-*SRK* のゲノム完全長については各々の cDNA の配列 (AB211198、AB211197、AB008191) を基に作成したプライマー (Table S1) を用いて、各 *S* ハプロタイプホモ個体のゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅した。

*SRK* から *SMI2* までのゲノム配列は *S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub> ハプロタイプに関してはすでにシーケンスが得られており (三浦、未発表)、*S*<sub>44</sub> ハプロタイプに関しては *SRK* と *S*<sub>44</sub>-*SMI2* に特異的なプライマー (Table S1) を用いて PCR 増幅した。

*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプにおいて、*SMI2* から *SLG* までのゲノム領域は各 *SMI2* に特異的なプライマーと各 *SLG* の cDNA 配列 (AB054059、AB054058) を基に作成したプライマー (Table S1) を用いて PCR 増幅した。

*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプの *SLG* 下流から *S* 遺伝子座近傍領域 (*S*-flanking region 2) までのゲノム領域は各 *SLG* に特異的なプライマーと *S*<sub>60</sub> ハプロタイプの *S*-flanking region 2 領域を基にして作成したプライマーを用いて PCR 増幅した。

PCR 条件は、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて、[94°C, 2 min, (98°C, 10 sec, 74°C, 10min) × 5 cycles, (98°C, 10 sec, 72°C, 10min) × 5 cycles, (98°C, 10 sec, 70°C, 10min) × 5 cycles, (98°C, 10 sec, 68°C, 10min) × 30 cycles] とした。

*SRK* のゲノム完全長を増幅する PCR に関しては PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、[94°C, 2 min, (98°C, 10 sec, 60°C, 15 sec, 68°C, 10min) × 30 cycles] とした。

得られた 10 kb 以下の PCR 産物は電気泳動後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon genetics co. ltd) を用いてゲルより回収・精製した。精製 PCR 産物は TOPO® XL PCR Cloning Kit を用いて pCR-XL-TOPO ベクターに導入し、M13 reverse プライマー、T7 プライマーを用いてシーケンスを行った。その後、順次得られたゲノム配列を基にプライマーを作成し、シーケンスを行った。

10 kb 以上の PCR 産物に関しては、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon genetics co. ltd) を用いて精製し、精製 PCR 産物を DNA Fragmentation Kit (TaKaRa) を用いて断片化した。断片化された PCR 産物を電気泳動後、1500 bp—5000 bp の断片を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon genetics co. ltd) を用いてゲルより回収・精製し、10 × Ex Taq Buffer (TaKaRa)、2.5 mM dNTP Mixture (TaKaRa)、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を加え、72°C で 10 分間インキュベートすることで 3' 末端に A を付加した。pGEM T-easy (Promega) にクローニング後、大腸菌宿主 DH5α へ形質転換した。生じたコロニーは M13 プライマーを用いた PCR 反応によりインサートを増幅し、500 bp 以上のインサートが導入されたクローンのインサートを T7 プライマー、SP6 プライマーを用いてシーケンスを行い、GENETYX-WIN ソフトウェアを用いてアセンブルを行った。

### 低分子 RNA 前駆体領域の予測

各 Class-II *S* ハプロタイプのゲノム配列中に存在する逆位反復配列は *einverted* プログラム (Rice *et al.*, 2000)、GENETYX-WIN ソフトウェア、*miRPara* プログラム (Wu *et al.*, 2011) の 3 つのソフトウェアを用いて予測した。*einverted* プログラムでは window size を 350 bp に設定し、それ以外はデフォルトのパラメータで解析した。その後、予測された逆位反復配列の中から terminal loop サイズが 50 bp 以下のものを選び出した。GENETYX-WIN ソフトウェアでは match % of stem parts = 75、max size of stem parts = 200、min size of stem parts = 30、max size of loop parts = 50、min size of loop parts = 4 に設定し、解析を行った。*miRPara* プログラムではデフォルトのパラメータで解析を行った。3 つのプログラムにより得られた逆位反復配列を RNAfold プログラム (Lorenz *et al.*, 2011) を用いて 2 次構造を予測し、 $-25 \text{ kcal mol}^{-1}$  以下の低いエネルギーを持つ逆位反復配列のみを選抜した。各逆位反復配列と *S*<sub>44</sub><sup>-</sup>、*S*<sub>60</sub><sup>-</sup>、*S*<sub>40</sub><sup>-</sup>、*S*<sub>29</sub>-*SP11* 遺伝子の反訳開始点上流 1 kb から終止コドン下流 1 kb までのゲノム配列を BLAST 検索を行い、 $10^{-3}$  以下の *E*-value を示した逆位反復配列に対して、当研究室で作製された各 Class-II ホモ個体の *SP11* の発現が始まるステージ 3 を含むそれ以前のステージの葯の低

分子 RNA シークエンスリード (総リード 11,384,786—17,257,506) (樽谷、未発表) を *bowtie* プログラム (Langmead *et al.*, 2009) を用いて、各逆位反復配列に完全一致する配列のみをマッピングした。

### Stem-loop RT-PCR 法による *Smi2* の発現解析

*S60*、*S40*、*S29* ハプロタイプに関して、Stem-loop RT-PCR 法 (Chen *et al.*, 2005) を用いて *Smi2* の検出を行った。*S60S60*、*S40S40*、*S29S29* ホモ個体のステージ 1—3 の葯から *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて低分子 RNA 画分を抽出し、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて添付のプロトコールに従って逆転写反応を行った。逆転写には *Smi2* に特異的な stem-loopRT プライマーと、コントロールとして *mir166* に特異的な stem-loopRT プライマー (Table S1) を用いた。得られた逆転写産物を鋳型として、Light Cycler 480 Probe Master (Roche)、Universal Probe Library (Roche) を用いて定量 PCR を行った。PCR には各 *Smi2* に特異的なプライマー、*mir166* に特異的なプライマーおよび stem-loopRT プライマー領域に特異的な universal プライマーを用いた (Table S1)。反応のサイクル条件は [95°C, 5 min, (95°C, 10 sec, 58°C, 30 sec, 72°C, 1 sec) × 55 cycles, 50°C 10 sec] とした。

### 低分子 RNA と標的配列との配列相同性解析

低分子 RNA と標的配列との相補性に関しては *mispair score* システムの計算法を用いて精査した (Fahlgren and Carrington, 2010)。*mispair score* の計算法は以下の通りである。ミスマッチ、1 塩基の *bulge*・*gap* は 1 ポイント、G:U のゆらぎ塩基対は 0.5 ポイントのペナルティとした。また、低分子 RNA の 5' 末端から数えて 2—13 塩基を“コアセグメント”とし、コアセグメント内のペナルティを 2 倍にして計算を行った。

### 形質転換体における *SP11* の発現解析

*S*<sub>60</sub>ハプロタイプの *SMI2*を含む 2.9 kb のゲノム断片が導入された *B. rapa* cv *Osome* (*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>) に、順次各 Class-II のホモ個体と交配することで *S*<sub>60</sub>-*SMI2*ゲノム領域が導入された Class-II ホモ個体を得た (日置, 2013; 下田, 2014; 三浦, 未発表)。各 Class-II ホモ個体及び *S*<sub>60</sub>-*SMI2*ゲノム領域が導入された各 Class-II ホモ個体のステージ 4、5 の蒴から RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い total RNA を抽出した。定量 PCR は、QuantiFast™ SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従い、各ハプロタイプ特異的な *SP11*プライマーセットを用い行った (Table S1)。内部標準には *GAPDH* 遺伝子を用いた。

### *SP11* プロモーターのメチル化解析

タペート組織の DNA 抽出は当研究室柴らの方法に従って行った (Shiba *et al.*, 2006)。 *S*<sub>40</sub>*S*<sub>40</sub>、 *S*<sub>29</sub>*S*<sub>29</sub>ホモ個体並びに *S*<sub>60</sub>-*SMI2*が導入された *S*<sub>40</sub>*S*<sub>40</sub>、 *S*<sub>29</sub>*S*<sub>29</sub>ホモ個体のステージ 4、5 の蒴を 4 °C に冷やした抽出バッファー [0.05 M HePes-NaOH (pH 7.5)、0.8 M sucrose] 上でカミソリを用いて細かく切断した。上記抽出物を 10 μm ×10 μm のナイロンメッシュ (共進理工) に通し、花粉を除いた。濾液を 500 × g で 4 °C で 5 分間遠心して、上清をもう一度 10 μm ×10 μm のナイロンメッシュ (共進理工) に通した。濾液を 4 °C、3500 × g で 10 分間遠心し、ペレットから DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って DNA 抽出を行った。得られたタペート DNA は Methyl Easy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signatures) を用いて、添付のプロトコールに従って bisulphite 処理を行った。bisulphite 処理を行ったゲノム DNA を鋳型として各 Class-II *SP11* 特異的なプライマーを用いて PCR を行った (Table S1)。

## 1-3 結果

### *S*<sub>44</sub>, *S*<sub>60</sub>, *S*<sub>40</sub> ハプロタイプのゲノム配列の決定

本章の序で述べたように Class-II 間に見られる直線的な優劣性を制御する候補因子として *Smi2* がこれまでに見出されていたが、Class-II *S* 遺伝子座の配列情報は一部に限られており、他の候補因子が存在しているかどうかは不明であった。

*SP11* や *SRK* が座乗する *S* 遺伝子座は *S* ハプロタイプ間で非常に多様性に富んでおり、一方 *S* 遺伝子座の近傍領域の配列 (*S*-flanking region 1, 2) は、*S* ハプロタイプ間で保存されている (Fukai *et al.*, 2003)。この *S* 遺伝子座内の配列多様性は *S* ハプロタイプ間での組換え抑制に寄与していると考えられている。Class-II 間の優劣性が低分子 RNA によって制御されているのであれば、その低分子 RNA は組換えが起きない *S* 遺伝子座領域内にコードされていると考えられ、そこで、Class-II 間の優劣性を制御する他の低分子 RNA 候補因子の関与を検証するために、*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプのゲノム配列の決定を試みた。

*S*<sub>60</sub> ハプロタイプについては *SP11*, *SRK*, *SLG* 遺伝子を含む 86.4 kb の部分的なゲノム配列が報告されており (Fukai *et al.*, 2003)、その配列には *S* ハプロタイプ間で保存されている *S*-flanking region 2 は含まれていたものの *S*-flanking region 1 領域は含まれていなかった。そこで、*S*-flanking region 1 から *SP11* までの配列を PCR 増幅し、これまでに報告されている 86.4 kb の配列とアセンブルすることで 90.8 kb の *S* 遺伝子座配列を得た (Fig. 1-1)。

*S*<sub>44</sub> ハプロタイプに関しては *SP11* から *SRK* の一部配列を含む 14.0 kb の配列が以前に報告されていた (Kakizaki *et al.*, 2006)。そこで、*S*-flanking region 1—*SP11*、*SRK* 完全長配列、*SRK*—*SMI2*、*SMI2*—*SLG*、*SLG*—*S*-flanking region 2 を PCR により増幅し、シーケンスを行うことで 60.3 kb の *S* 遺伝子座配列を得た (Fig. 1-1)。

*S*<sub>40</sub> ハプロタイプに関しても同様に *SP11* から *SRK* の一部配列を含む 15.0 kb の配列が既に報告されており (Kakizaki *et al.*, 2006)、また *SRK*—*SMI2* の配列は本研究室三浦により明らかとなっていたため (三浦, 未発表)、*S*-flanking region 1—*SP11*、*SRK* 完全長配列、



*SMI2*—*SLG*、*SLG*—*S*-flanking region 2 を PCR により増幅することで 64.5 kb の *S* 遺伝子座配列を得た (Fig. 1-1)。

### 低分子 RNA 産生領域の探索

*B. rapa* の Class-I/Class-II 間の優劣性を制御する *Smi* や、microRNA と呼ばれる低分子 RNA はヘアピン構造から生産されることが知られている (Tarutani *et al.*, 2010; Axtell, 2013)。そこで、*einverted*、GENETYX、*miRPara* の 3 つのソフトウェアを用いて、各 *S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプのゲノム配列から逆位反復配列を予測した。その結果、*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプのゲノム配列からそれぞれ 18、18、15 個の逆位反復配列が予測された (Table 1-1—3)。それらの逆位反復配列の中には Class-I/Class-II 間の優劣性を制御する *SMI* と、これまでに Class-II 間の優劣性を制御する候補として見出されていた *SMI2* が含まれていた。*SMI* はこれまで Class-I *S* ハプロタイプと Class-II *S* ハプロタイプの *S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub> ハプロタイプにおいて存在が確認されていたが (Tarutani *et al.*, 2010)、本研究による *S* 遺伝子座のシーケンスによって *S*<sub>44</sub> ハプロタイプにおいても *SMI* が存在していることが明らかとなった (Fig. 1-1, Table 1-1)。

次に、同定された逆位反復配列中に *SP11* 遺伝子領域と相同性の高い領域が含まれるかどうかを検証した。各逆位反復配列と *S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub>-*SP11* 遺伝子の翻訳開始点上流 1 kb から終止コドン下流 1 kb までのゲノム配列を BLAST 検索し、*E*-value を求めた。各 *SP11* 遺伝子に対して 10<sup>-3</sup> オーダー以下の *E*-value を示した逆位反復配列に対しては、低分子 RNA 生産の有無を確認した。本研究室樽谷によって作製された *S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub> ハプロタイプのホモ個体の *SP11* の発現が始まるステージ 3 を含むそれ以前のステージの薬の低分子 RNA シーケンスデータ (総リード : 11,384,786—17,257,506) のシーケンスリードをマッピングした。しかしながら、*SMI* と *SMI2* 以外で *SP11* 遺伝子に対して相同性の高い低分子 RNA を生産する逆位反復配列は得られなかった (Table 1-1—3)。以上の結果、Class-II 間の優劣性を制御する因子として *SMI2* 以外の新たな候補が Class-II *S* 遺伝子座に存在していないことが示されたため、*SMI2* についてさらに詳細に解析することにした。

## 低分子 RNA の発現解析

*Smi2* 配列は Class-II *SP11* プロモーターの *Smi* による標的サイトのすぐ上流の領域と高い相同性を示しており、興味深いことに *Smi* が認識する標的の逆鎖側を標的としている。各 *Smi2* 配列は自己よりも劣性の *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対して 21 塩基中 18 塩基以上の高い相同性を示している (Fig. 1-2 A, B)。最劣性の *S*<sub>29</sub> ハプロタイプがコードする *Smi2* は自己の *SP11* プロモーターに対して 21 塩基中 18 塩基の高い相同性を示しており、実際に生産されていると自己の *SP11* の発現を抑制してしまうという可能性が推測された (Fig. 1-2 B)。そこで、葯における各 *Smi2* 前駆体からの低分子 RNA のプロセシング様式を、先に述べた低分子 RNA 超並列シーケンスデータをもとに整理した (樽谷・三浦, 未発表; Fig. 1-3 A)。この解析からは *S*<sub>29</sub>-*Smi2* の生産は確認されなかったが、*S*<sub>60</sub>-*Smi2* に関しても 2 リードしか検出されず、*S*<sub>29</sub>-*Smi2* が本当に生産されていないかどうか疑問であった (樽谷・三浦, 未発表; Fig. 1-3 A)。そこで、さらに *Smi2* の生産を確認するために低分子 RNA を特異的に検出する stem-loop RT-PCR 法 (Chen *et al.*, 2005; Fig. 1-3 B) を用いて *S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>*S*<sub>40</sub>、*S*<sub>29</sub>*S*<sub>29</sub> 各 Class-II ホモ個体の葯から *Smi2* の検出を試みた。その結果、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub>*S*<sub>40</sub> ホモ個体からそれぞれ *S*<sub>60</sub>-、*S*<sub>40</sub>-*Smi2* は検出できたが、*S*<sub>29</sub>*S*<sub>29</sub> ホモ個体からは *S*<sub>29</sub>-*Smi2* を検出することはできなかった (Fig. 1-3 C)。以上のことから *S*<sub>29</sub>-*SMI2* ゲノム領域からは *SP11* 遺伝子と相同性の高い 24 塩基の *S*<sub>29</sub>-*Smi2* は生産されていないことが明らかとなり、*S*<sub>29</sub>-*Smi2* による自己抑制の矛盾は解決されたため、*Smi2* が Class-II 間の優劣性を制御する因子である可能性が強く示唆された。

## *Smi2* 前駆体の二次構造解析

前項で示したとおり、各 Class-II *SMI2* ゲノム領域から低分子 RNA の発現を解析したところ、*S*<sub>44</sub>、*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>40</sub> ハプロタイプからは 24 塩基の *Smi2* の生産が確認されたが、最劣性の *S*<sub>29</sub> ハプロタイプからは *Smi2* 前駆体から低分子 RNA が生産されているものの、*Smi2* の生産

は確認されなかった (Fig.1-3 A, C)。microRNA の生産は前駆体の構造によって影響を受けることが知られているため、各 Class-II ハプロタイプの *Smi2* 前駆体の二次構造を RNAfold プログラムを用いて予測し、各 *Smi2* 前駆体の二次構造を比較した。その結果、*S<sub>29</sub>-Smi2* 前駆体は *S<sub>44</sub>*、*S<sub>60</sub>*、*S<sub>40</sub>-Smi2* 前駆体の二次構造とは異なる構造を取っていた (Fig. 1-4)。Lower stem においては他の *S* ハプロタイプの *Smi2* 前駆体とは違う位置に bulge (ミスマッチ構造) が存在しており、*Smi2* 領域の中央部分にも大きな bulge が存在していた。また、terminal loop においても他のハプロタイプとは違い 2 つに別れたループ構造を取っていた。いずれも microRNA のプロセッシングに関わる重要な領域であり (Bologna *et al.*, 2009, Mateos *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2013)、それらの領域に変異が入り、二次構造が変化したことで、プロセッシングの様式が変化し、*SP11* プロモーターに対して相溶性の高い *S<sub>29</sub>-Smi2* が生産されなくなった可能性が考えられた。

### *Smi2* と標的 *SP11* プロモーターとの相溶性解析

各 *Smi2* は自己よりも劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対して 21 塩基中 18 塩基以上の相溶性を示しており、自己や自己よりも優性 *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対しては 21 塩基中 17 塩基以下の低い相溶性を示している (Fig. 1-2 B)。この相溶性の違いが Class-II 間の優劣性を制御すると考えられた。さらに、今回低分子 RNA と標的の相溶性を、新たな指標を用いて解析を試みた。植物における低分子 RNA と標的との相互作用には 2—13 番目の塩基 (コアセグメント) の相溶性が重要であり、コアセグメント内のミスマッチは非常に少ないことが知られている (Axtell, 2013)。このコアセグメントにおける相溶性と G·U のゆらぎ塩基対を考慮した 21 塩基の microRNA による (切断) 標的を予測する方式として mispair score という指標が報告されている (Fahlgren and Carrington, 2010)。mispair score は 24 塩基 microRNA による DNA のメチル化の標的予測としても報告例があり (Wu *et al.*, 2010)、本 score を用いて *Smi2* と *SP11* プロモーターとの相溶性評価を試みた。その結果、*Smi2* は自己よりも劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対して 3.5—5.5 の低い値を示すが、自己や自己よりも優性 *S* ハプロタイプの *SP11* プ

ロモーターに対しては 6.5—7.5 の高い値を示していた (Fig. 1-2 B)。さらに、Class-I/Class-II 間を制御する *Smi* に関しても mispair score を用いて Class-II *SP11* プロモーターとの相同性を再評価した。Class-I *S* ハプロタイプが生産する *Smi* と Class-II *S* ハプロタイプが生産する *Smi* では 10 番目の塩基が異なっており、Class-I *Smi1* は Class-II *SP11* プロモーターに対して 5.5 以下の mispair score を示していたが、Class-II *Smi* は 6.5—7.5 の高い値を示していた (Fig. 1-5)。これらの結果から、*B. rapa* では *Smi* や *Smi2* が自己よりも劣性の *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対して mispair score 5.5 以下の高い相同性を示すことで複雑な優劣性を制御しうることが示唆された。

### *S<sub>60</sub>-Smi2* の機能証明

*Smi2* が自己よりも劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* の発現を抑制するかどうかを調べるために、形質転換体が作製されてきた。*S<sub>60</sub>* ハプロタイプの *SMI2* を含む 2.9 kb のゲノム断片を *B. rapa* 栽培品種「おそめ」(*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>*) に導入し、順次各 Class-II ホモ個体と交配することで、各 Class-II ホモ個体に *S<sub>60</sub>-SMI2* ゲノム領域が導入された形質転換個体が作成された (日置, 2013; 下田, 2014; 三浦, 未発表)。*S<sub>60</sub>-SMI2* 導入遺伝子により *SP11* の発現が抑制されるかどうかを定量 PCR によって解析したところ、自己である *S<sub>60</sub>* ハプロタイプや優性の *S<sub>44</sub>* ハプロタイプのホモ個体に導入した場合、*SP11* 遺伝子の発現はそれぞれの野生株と比べて変化は無かったが、*S<sub>60</sub>* ハプロタイプよりも劣性の *S<sub>40</sub>*、*S<sub>29</sub>* ハプロタイプのホモ個体に導入した際は、各 *SP11* 遺伝子の発現が野生株の数万分の 1 以下にまで強く抑制されていた (Fig. 1-6)。このことから、*S<sub>60</sub>-Smi2* が自己よりも劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* の発現を抑制していることが明らかとなった。

Class-II *S* ハプロタイプのヘテロ個体では *SP11* の発現が開始されるよりも早期ステージの葯タペート組織において、劣性 *SP11* プロモーターのメチル化が確認されている (Shiba *et al.*, 2006)。そこで、*S<sub>60</sub>-SMI2* 導入遺伝子により、劣性 *S<sub>40</sub>*、*S<sub>29</sub>-SP11* プロモーターのメチル化が誘導されるかどうかをバイサルファイト PCR 法により解析した。通常 *S<sub>40</sub>S<sub>40</sub>* ホモ個体において *S<sub>40</sub>-SP11* プロモーターのメチル

化は確認されないが、*S*<sub>60</sub>-*SMI2*が導入された *S*<sub>40</sub>*S*<sub>40</sub>ホモ個体では *S*<sub>60</sub>*S*<sub>40</sub>ヘテロ個体で見られるような *S*<sub>40</sub>-*SP11*プロモーターのメチル化が確認された (Fig. 1-7)。同様に *S*<sub>60</sub>-*SMI2*が導入された *S*<sub>29</sub>*S*<sub>29</sub>ホモ個体においても *S*<sub>60</sub>*S*<sub>29</sub>ヘテロ個体で見られるような *S*<sub>29</sub>-*SP11*プロモーターのメチル化が確認された (Fig. 1-7)。これらの結果、優性 *S*ハプロタイプの *Smi2*が劣性 *S*ハプロタイプの *SP11*プロモーターをメチル化することで *SP11*の発現を抑制していることが示唆された。

## 1-4 考察

本章では *B. rapa* の Class-II 間に見られる 4 つのハプロタイプ間の直線的な優劣性 ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) が、たった 1 つの低分子 RNA (*Smi2*) によって制御されていることを明らかにした。Class-I/Class-II 間の優劣性制御を明らかにした先行研究と合わせると (Tarutani *et al.*, 2010)、*B. rapa* で見られる複雑な優劣性は僅か 2 種類の低分子 RNA により制御されていることが明らかとなった。

本章より、全ての Class-II *S* ハプロタイプより *SMI* 逆位反復配列の存在が確認された (Fig. 1-1)。また、超並列シーケンサー解析から全ての Class-II *S* ハプロタイプにおいて、少ないながらも葯における *Smi* の生産が確認された (データ未掲載)。Class-II *Smi* は 1 塩基違いによって機能を失っていると考えられていたが、*SMI* が全ての Class-II *S* ハプロタイプにも存在しており 24 塩基 *Smi* が生産されていることから Class-II *Smi* は何らかの機能を保持している可能性が予想される。Class-II *S* ハプロタイプに対して劣性である *S* ハプロタイプは同定されていないが、Class-II *Smi* はそれらの *S* ハプロタイプとの優劣性を制御しているのかもしれない。

低分子 RNA は標的配列に対して mispair score 5.5 以下の値を示した時、メチル化を誘導し、標的 *SP11* 対立遺伝子の発現を抑制することが強く示唆された。一方、6.5 以上の mispair score を示した時は標的とならないと考えられ (Fig. 1-2 B; Fig. 1-5)、本優劣性現象において 24 塩基低分子 RNA による標的配列の認識の閾値は 5.5—6.5 の間に存在することが示唆された。*Smi* や *Smi2* はたった 1 塩基の違いで標的の認識が変化するため、低分子 RNA と標的の数塩基の変異によって複雑な優劣関係を形成することが可能となる。実際に *Smi2* は Class-II 間でたった 3 塩基の違いしかなく、*SP11* プロモーターの標的領域間においても数個の塩基置換しか見られない (Fig. 1-2 A)。これらの僅かな塩基置換が *Smi2* と *SP11* プロモーター間の mispair score の微妙な違いを生み出し、4 段階の直線的な優劣性を形成していると予想される (Fig. 1-2 B)。*SMI2* が全ての Class-II *SRK* の下流に存在しており、転写方向が保存されていることから (Fig. 1-

1) 、 *SMI2* は Class-II *S* ハプロタイプの共通祖先に出現し、多様な Class-II *S* ハプロタイプが分岐する過程で *Smi2* とその標的に変異が蓄積することで低分子 RNA—標的間相互作用が変化し、直線的な優劣性関係が形成されてきたことを示唆している。以上のことは、複雑な優劣性の形成に多数の低分子 RNA が進化する必要は無く、低分子 RNA とその標的が配列多型性を獲得することにより、複雑な優劣性が進化しうることを示唆している。これらの低分子 RNA は 1920 年代に Fisher が、優劣性を制御する因子として提唱した「ドミナンスモディファイヤー」(Fisher, 1928) に相当しており、今回示した低分子 RNA とその標的が塩基多型性を獲得することによって配列相同性依存的に階層的な優劣性が進化するモデルを “Polymorphic dominance modifier” モデルとして新たな優劣性進化モデルを提唱する (Fig. 1-8 A) 。

近年、フランスのリール第 1 大学の研究グループは自家不和合性アブラナ科植物である *Arabidopsis halleri* における花粉側対立遺伝子間の優劣性の研究から、直線的な優劣性を制御するモデルとして 2 つのモデルを提唱した (Durand *et al.*, 2014) 。1 つは優性の *S* ハプロタイプほど多くの低分子 RNA を持つというモデル 1 であり、2 つ目は劣性の *S* ハプロタイプほど多くの標的配列を持つというモデル 2 である。いずれにせよ、 $n$  個の *S* ハプロタイプ間の直線的な優劣性には  $n-1$  個の低分子 RNA が関与するモデルを提唱している (Fig. 1-8 B) 。以上の Durand らが提唱する多数の低分子 RNA とその標的により複雑な優劣性が進化するというモデルは “Multiple dominance modifier” モデルとして表現することができ、本章で提唱した “Polymorphic dominance modifier” モデルとは全く違ったモデルである。

続く第 2 章では、*B. rapa* で示された “Polymorphic dominance modifier” モデルの正当性を確認するべく、多数の低分子 RNA とその標的が優劣性制御に関わるというモデルが立てられた *A. halleri* に近縁の *A. lyrata* に見られる優劣性現象の解析を試みた。

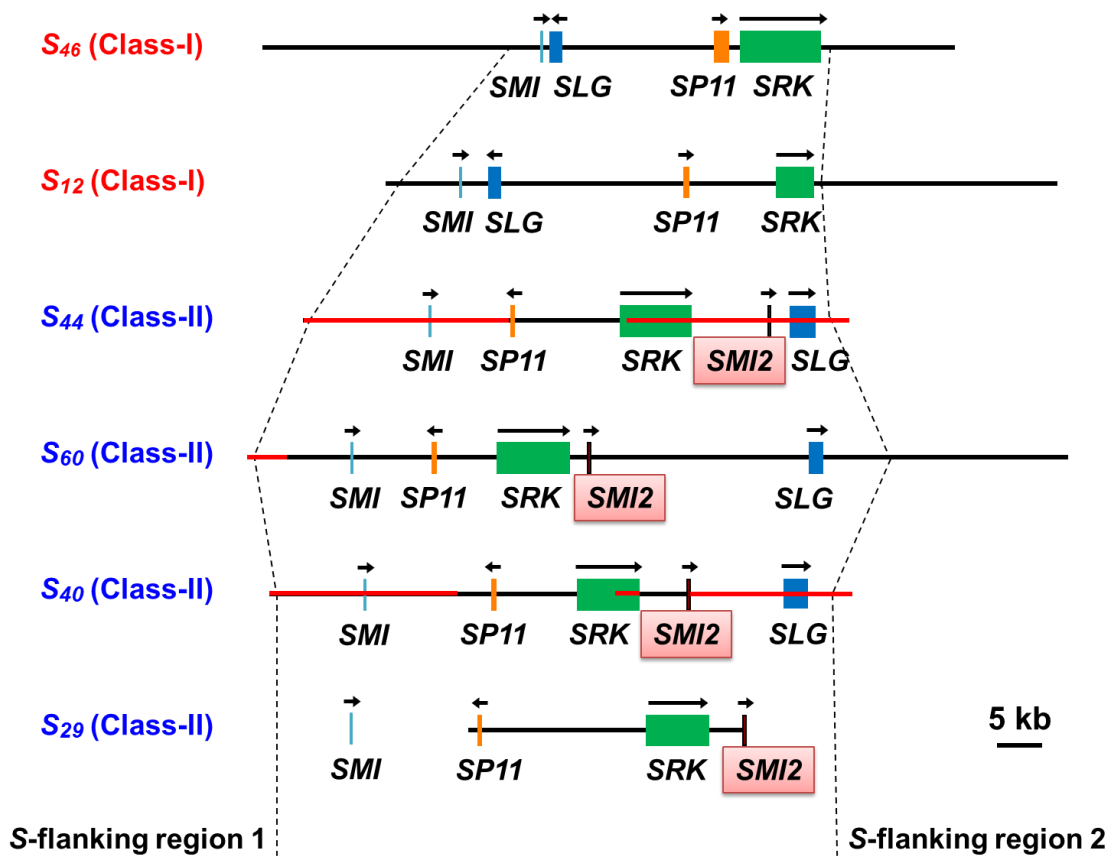


Fig. 1-1. 各  $S$  遺伝子座の構造

Class-I の  $S_{12}$ 、 $S_{46}$  ハプロタイプのゲノム配列は Shiba *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2002 より引用した。 $SP11$ 、 $SRK$ 、 $SLG$  遺伝子をそれぞれ橙、緑、青の box で示した。逆位反復配列  $SMI$ 、 $SMI2$  をそれぞれ水色、赤で示した。矢印は転写の向きを表している。本研究で明らかにしたゲノム領域を赤線で示す。



Table 1-1 *S44* ハプロタイプにおける逆位反復配列予測

Seq pos.	Strand	Program	E-value			
			<i>S44-SP11</i>	<i>S60-SP11</i>	<i>S40-SP11</i>	<i>S29-SP11</i>
7809-7931	+	E, G	0.011	9.00E-04*	0.011	0.011
7801-7939†	-	E, G	0.012	1.00E-03	0.012	0.012
8692-8799	+	G	0.032	0.110	8.00E-04*	0.032
8692-8799†	-	G	0.032	0.110	8.00E-04	0.032
8772-8842	+	G	0.840	0.240	2.900	0.840
14032-14141 ( <i>SM1</i> )	+	E, G, M	0.003	0.003	0.003	0.003
14032-14141	-	E, G, M	0.003*	0.003*	0.003*	0.003*
26530-26753	-	E	N. H	N. H	N. H	N. H
28873-28937	+	E, G, M	2.600	0.220	0.062	2.600
28873-28937	-	E, G, M	2.600	0.220	0.062	2.600
44592-44690	-	G	0.350	0.100	0.029	0.100
46184-46292	+	M	0.390	4.800	0.032	0.110
46407-46495	+	E, G	N. H	N. H	N. H	3.800
46416-46483	-	E, G, M	9.700	N. H	9.700	2.800
46494-46549	+	G	2.200	7.600	7.600	7.600
46496-46547	-	G	2.000	6.900	6.900	6.900
51290-51461 ( <i>SM2</i> )	+	E, M	0.053	8.00E-06	0.001	6.00E-08
51295-51456	-	E	0.050	3.00E-05*	0.001*	5.00E-08*

3種類のソフトウェアを用いて予測された逆位反復配列と、得られた配列をクエリーとして各 Class-II *SP11* ± 1000 bp に対して BLAST search した際の *E*-value を示す。

“Seq pos.” はゲノム領域上の位置を表す。

“Program” は予測されたソフトウェアを示しており、E、G、M はそれぞれ einverted、Genetyx、miRPara プログラムを表す。

“N. H.” は BLAST search によって相同性を示さなかったことを表す。

“†” は次世代シーケンサー解析により、100%マッチの低分子 RNA の生産が確認されなかった逆位反復配列を示す。

“\*” は *SP11* に対して高い相同性を示す低分子 RNA の生産が逆位反復配列から確認されなかったことを表している。

**Table 1-2** *S*<sub>60</sub>ハプロタイプにおける逆位反復配列予測

Seq pos	Strand	Program	E-value			
			<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i>
4092-4182	-	M	0.320	0.320	1.100	0.320
11101-11170	-	M	0.820	0.820	0.820	0.680
11417-11508 ( <i>SMI</i> )	+	E, G, M	0.002	0.002	0.002	0.002
11417-11508†	-	E, G, M	0.002	0.002	0.002	0.002
21931-22029†	-	M	2.00E-04	6.00E-05	7.00E-04	4.00E-26
37098-37225 ( <i>SMI2</i> )	+	E, G, M	0.140	0.011	2.00E-05	3.00E-10
37098-37225†	-	E, G	0.140	0.011	2.00E-05	3.00E-10
42424-42498	-	G	0.900	N. H	N. H	N. H
42450-42552	-	E, G	N. H	N. H	N. H	N. H
42464-42538	+	E, G	N. H	N. H	N. H	N. H
43043-43124	+	G	1.000	0.290	3.500	1.000
43044-43123	-	G, M	0.970	0.280	3.400	0.970
43091-43208	+	G	0.120	0.120	0.430	0.120
43184-43231	+	G	0.510	N. H	N. H	1.800
43184-43231	-	G	0.510	N. H	N. H	1.800
43204-43299	+	G	1.200	4.100	1.200	1.200
43204-43299	-	G	1.200	4.100	1.200	1.200
45514-45625	-	M	0.120	0.010	0.010	0.033

3種類のソフトウェアを用いて予測された逆位反復配列と、得られた配列をクエリーとして各 Class-II *SP11*±1000 bp に対して BLAST search により得られた *E*-value を示す。

“Seq pos.” はゲノム領域上の位置を表す。

“Program” は予測されたソフトウェアを示しており、E、G、M はそれぞれ einverted、Genetyx、miRPara プログラムを表す。

“N. H.” は BLAST search によって相同性を示さなかったことを表す。

“†” は次世代シーケンサー解析により、100%マッチの低分子 RNA の生産が確認されなかった逆位反復配列を示す。

**Table 1-3** *S*<sub>40</sub>ハプロタイプにおける逆位反復配列予測

Seq pos	Strand	Program	E-value			
			<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i>	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i>
4536-4616	+	E, M	N. H	N. H	0.081	3.400
4538-4614	-	E	N. H	N. H	0.760	N. H
5769-5876	+	M	1.400	1.400	1.400	1.400
7404-7556	+	E	0.580	2.000	7.000	2.000
7404-7556	-	E, M	0.580	2.000	7.000	2.000
10713-10804 ( <i>SM1</i> )	+	E, G, M	0.008	0.002	0.008	0.008
10713-10804†	-	E, G, M	0.008	0.002	0.008	8.00E-03
26768-26870†	+	G	0.370	0.009	0.370	6.00E-24
26773-26865†	-	G	0.330	2.70E-02	0.330	6.00E-23
36180-36333†	+	G	0.048	3.00E-04	0.014	0.004
36180-36333†	-	G	0.048	3.00E-04	0.014	0.004
46215-46388 ( <i>SM2</i> )	+	E, G, M	0.540	1.00E-04	0.001	3.00E-11
46221-46382†	-	E, G	0.050	3.00E-04	0.001	3.00E-11
47598-47759	+	E	0.001*	1.00E-04*	0.014	0.014
47598-47759†	-	E	0.001	1.00E-04	0.014	0.014

3種類のソフトウェアを用いて予測された逆位反復配列と、得られた配列をクエリーとして各 Class-II *SP11*±1000 bp に対して BLAST search により得られた *E*-value を示す。

“Seq pos.” はゲノム領域上の位置を表す。

“Program” は予測されたソフトウェアを示しており、E、G、M はそれぞれ einverted、Genetyx、miRPara プログラムを表す。

“N. H.” は BLAST search によって相同性を示さなかったことを表す。

“†” は次世代シーケンサー解析により、100%マッチの低分子 RNA の生産が確認されなかった逆位反復配列を示す。

“\*” は *SP11* に対して高い相同性を示す低分子 RNA の生産が逆位反復配列から確認されなかったことを表している。

# A

<i>S</i> <sub>44</sub>	3' -UUCUGUAUGUGCUUAAUUCACACA-5'	<i>Smi2</i>	
<i>S</i> <sub>60</sub>	3' -UUCUAUAUGUGUUAUUCCACACA-5'		
<i>S</i> <sub>40</sub>	3' -UUCUAUAUGUGCUUAAUUCACACA-5'		
<i>S</i> <sub>44</sub>	5' AGGATACACGCGAAAAGGTGTATC----	<i>Smi</i>	
<i>S</i> <sub>60</sub>	5' GTTACACACACGAATAAGGTGTGACCCGAA		
<i>S</i> <sub>40</sub>	5' AGTACACACACAATAAGGTGTGTC----		
<i>S</i> <sub>29</sub>	5' AGGAACACACGAATAAGGTGTGTC----		
		Class-I	<i>S</i> <sub>9</sub> 5' -AUGUUUACGUGUAAAAUAGUUACA-3'
			<i>S</i> <sub>12</sub> 5' -AUGUUUACGUGUAAAAUAGUUACA-3'
		Class-II	<i>S</i> <sub>44</sub> 5' -AUGUUUACGAGUAAAAUAGUUACA-3'
			<i>S</i> <sub>60</sub> 5' -AUGUUUACGAGUAAAAUAGUUACA-3'
			<i>S</i> <sub>40</sub> 5' -AUGUUUACGAGUAAAAUAGUUACA-3'
			<i>S</i> <sub>29</sub> 5' -AUGUUUACGAGUAAAAUAGUUACA-3'

# B

	<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>Smi2</i>	3' -UUCUGUAUGUGCUUAAUUCACACA-5'			
				mismatch	matched
				score	bases
Dominance	<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGATACACGCGAAAAGGTGTAT		(7.5)	(15/21)
	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i> pro	GTTACACACACGAATAAGGTGTGA		(5.5)	(18/21)
	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i> pro	AGTACACACACAATAAGGTGTGT		(5.5)	(18/21)
Recessive	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGAACACACGAATAAGGTGTGT		(3.5)	(18/21)
	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>Smi2</i>	3' -UUCUAUAUGUGUUAUUCCACACA-5'			
				mismatch	matched
				score	bases
Dominance	<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGATACACCGCGAAAAGGTGTAT		(7.0)	(16/21)
	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i> pro	GTTACACACACGAATAAGGTGTGA		(6.5)	(17/21)
	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i> pro	AGTACACACACAATAAGGTGTGT		(3.5)	(19/21)
Recessive	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGAACACACGAATAAGGTGTGT		(3.5)	(18/21)
	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>Smi2</i>	3' -UUCUAUAUGUGCUUAAUUCACACA-5'			
				mismatch	matched
				score	bases
Dominance	<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGATACACGCGAAAAGGTGTAT		(7.0)	(16/21)
	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i> pro	GTTACACACACGAATAAGGTGTGA		(6.5)	(17/21)
	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i> pro	AGTACACACACAATAAGGTGTGT		(6.5)	(17/21)
Recessive	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGAACACACGAATAAGGTGTGT		(3.5)	(18/21)
	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>Smi2</i>	3' -UUCUAUAUGUGCUUAAUUGCACACA-5'			
				mismatch	matched
				score	bases
Dominance	<i>S</i> <sub>44</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGATACACGCGAAAAGGTGTAT		(8.0)	(16/21)
	<i>S</i> <sub>60</sub> - <i>SP11</i> pro	GTTACACACACGAATAAGGTGTGA		(7.5)	(17/21)
	<i>S</i> <sub>40</sub> - <i>SP11</i> pro	AGTACACACACAATAAGGTGTGT		(7.5)	(17/21)
Recessive	<i>S</i> <sub>29</sub> - <i>SP11</i> pro	AGGAACACACGAATAAGGTGTGT		(4.5)	(18/21)

Fig. 1-2. *Smi2* と Class-II *SP11* プロモーターとの相同性

(A) *Smi* と *Smi2* の標的配列。低分子 RNA 間のミスマッチを緑色で、標的プロモーター間でのミスマッチを赤色で示した。*SP11* 遺伝子の薬での発現に必要なコア配列である region A と region B をそれぞれ

赤色、青色の下線で示した (第 3 章)。

(B) *Smi2* と *SP11* プロモーターとのアライメント。ミスマッチを赤色で、G-U ペアを緑色で示した。四角で囲われた領域は低分子 RNA の 5' 末端から数えて 2—13 番目の塩基であるコアセグメントを示している。

“mispair score” はミスマッチを 1、G-U ペアを 0.5 のペナルティとし、コアセグメント内のペナルティを 2 倍にして計算した値である。mispair score 5.5 以下の場合を橙色で示した。“mathed bases”は低分子 RNA の 5' 末端から 21 塩基中のマッチ塩基数を示した数値であり、G-U ペアはミスマッチとして計算している。21 塩基中 18 塩基以上の相同性を示した場合を橙色で示した。



得られたリード数を、終点部分の数字は低分子 RNA の塩基長を示している。マゼンタは 24 塩基の *Smi2* 配列を表している。(B) Stem-loop RT-PCR 法 (Chen *et al.*, 2005) の概要。マゼンタは加水分解プロローブの結合サイトを示している。“Q” はクエンチャー、“F” は蛍光色素を表している。PCR 増幅により、クエンチャーによる抑制が解除され蛍光を発する。(C) Stem-loop RT-PCR による *Smi2* の検出。*S60S60*、*S40S40*、*S29S29* ホモ株の葯から低分子 RNA 画分を抽出し、PCR を行った。

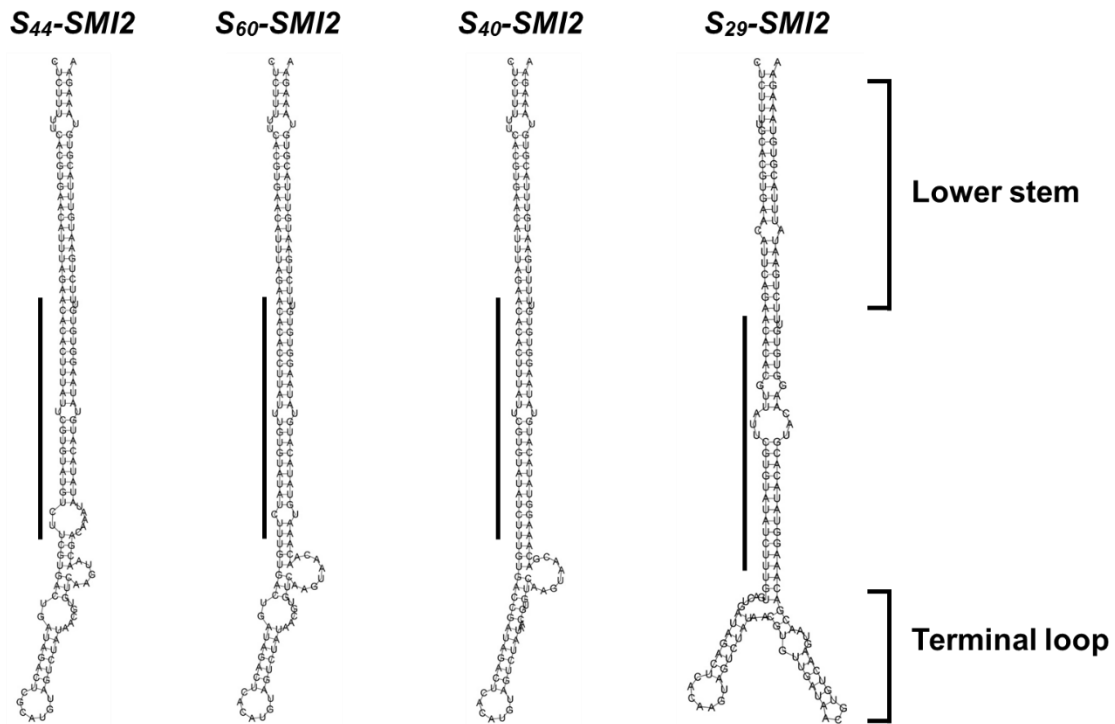


Fig. 1-4. *Smi2* 前駆体の二次構造

各 *Smi2* 前駆体の二次構造は RNAfold プログラムを用いて予測した。  
24 塩基の *Smi2* 配列を太線で示した。



<i>S<sub>9</sub>-Smi</i>	5' -AUGUUUACGUGUAAAUAAGUUACA-3'	mispair	matched
		score	bases
<i>S<sub>44</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(5.5)	(18/21)
<i>S<sub>60</sub>-SP11 pro</i>	3' -ACAAATGCACATITTTATCCGTTA-5'	(4.5)	(18/21)
<i>S<sub>40</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(5.5)	(18/21)
<i>S<sub>29</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(5.5)	(18/21)
<i>S<sub>60</sub>-Smi</i>	5' -AUGUUUACGAGUAAAUAAGUUACA-3'	mispair	matched
		score	bases
<i>S<sub>44</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(7.5)	(17/21)
<i>S<sub>60</sub>-SP11 pro</i>	3' -ACAAATGCACATITTTATCCGTTA-5'	(6.5)	(17/21)
<i>S<sub>40</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(7.5)	(17/21)
<i>S<sub>29</sub>-SP11 pro</i>	3' -TACAAATGCACACITTTATCCGTTA-5'	(7.5)	(17/21)

Fig. 1-5. *Smi* と Class-II *SP11* プロモーターとの相同性

ミスマッチを赤色で、G-U ペアを緑色で示した。四角で囲われた領域は低分子 RNA の 5' 末端から数えて 2—13 番目の塩基であるコアセグメントを示している。

“mispair score” はミスマッチを 1、G-U ペアを 0.5 のペナルティとし、コアセグメント内のペナルティを 2 倍にして計算した値である。mispair score 5.5 以下の場合を橙色で示した。“mathed bases” は低分子 RNA の 5' 末端から 21 塩基中のマッチ塩基数を示した数値であり、G-U ペアはミスマッチとして計算している。21 塩基中 18 塩基以上の相同性を示した場合を橙色で示した。

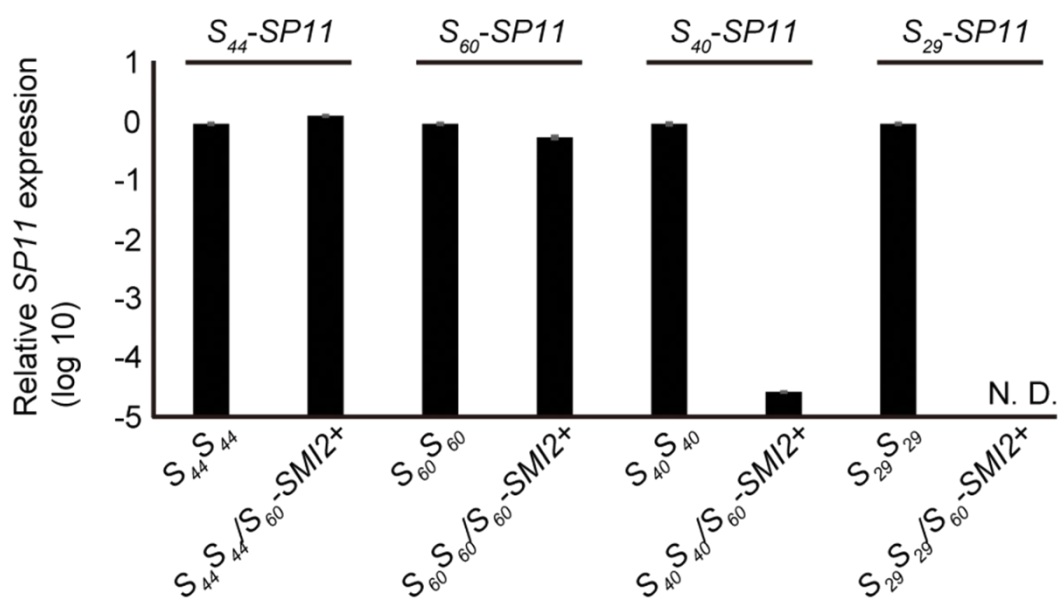


Fig. 1-6.  $S_{60}$ - $SMI2$  導入株における Class-II  $SP11$  遺伝子の発現解析

定量 PCR を用いて、各 Class-II  $S$  ハプロタイプのホモ株並びに  $S_{60}$ - $SMI2$  導入株における  $SP11$  遺伝子の発現量解析を行った。内部標準には  $GAPDH$  を用いた。N.D. は検出されなかったことを表す。

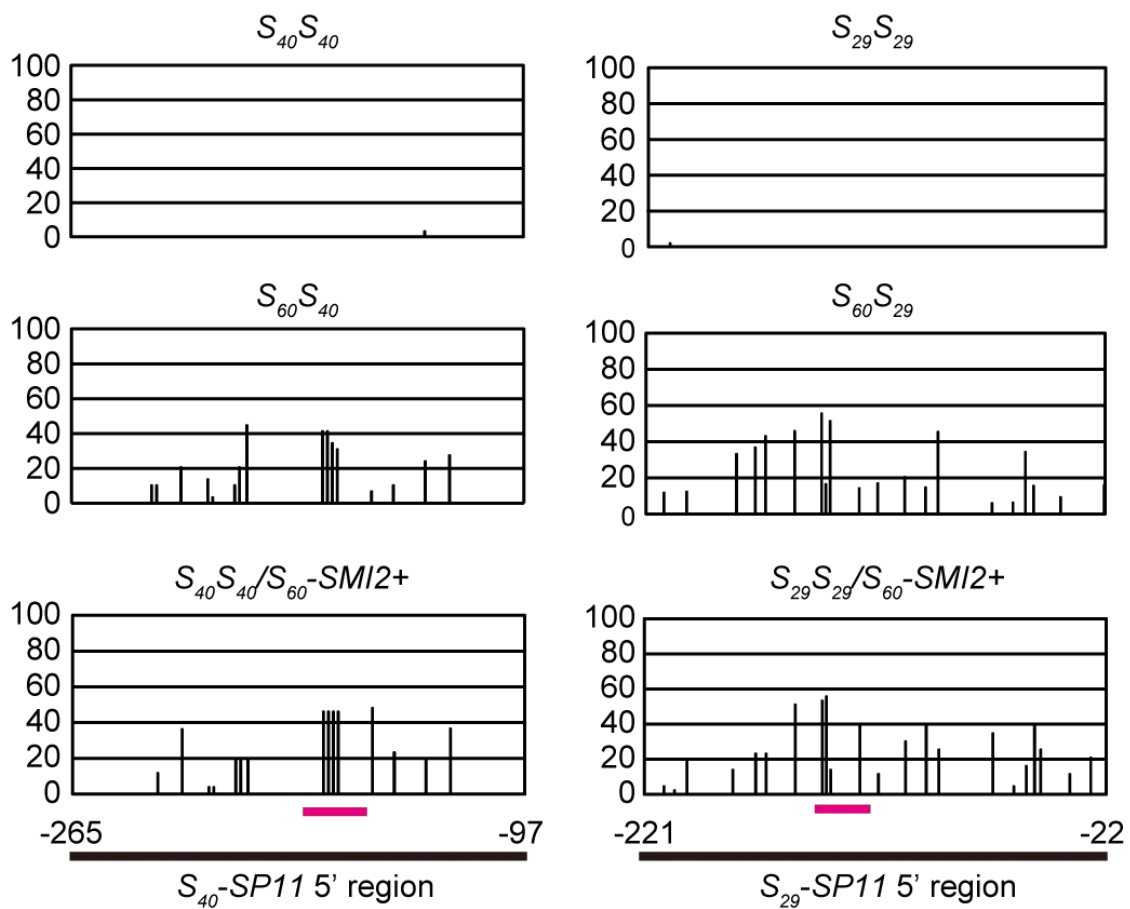


Fig. 1-7.  $S_{60}$ - $SMI2$  導入株における  $S_{40}$ -、 $S_{29}$ - $SP11$  プロモーターのメチル化解析

$S_{40}S_{40}$ 、 $S_{29}S_{29}$  ホモ個体並びに  $S_{60}$ - $SMI2$  導入個体、 $S_{60}S_{40}$  ヘテロ個体、 $S_{60}S_{29}$  ヘテロ個体の  $S_{40}$ -、 $S_{29}$ - $SP11$  プロモーターのメチル化を解析した。ダイアグラムの下に数字は  $SP11$  の翻訳開始点を 1 とした時の数値を示している。 $Smi2$  の標的サイトはマゼンタの太線で表した。

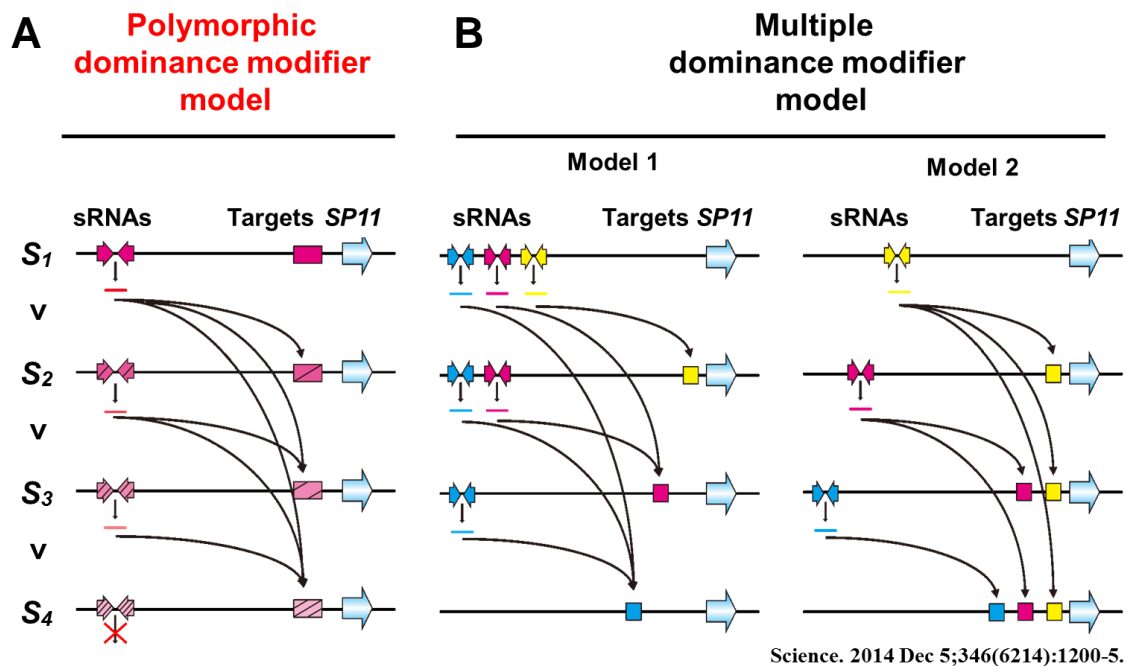


Fig. 1-8. 低分子 RNA を介した直線的な優劣性の制御モデル

(A) “Polymorphic dominance modifier” モデルは低分子 RNA とその標的の多型性により複雑な優劣性が形成されることを示している。*B. rapa* Class-II の場合では最劣性の *S* ハプロタイプの低分子 RNA は生産されなくなっている。

(B) “Multiple dominance modifier” モデルは多数の低分子 RNA が関与するというモデルであり、更に 2 つのモデルに分けられる。1 つは優性の *S* ハプロタイプ程多くの低分子 RNA を持つモデル 1 であり、もう 1 つは劣性の *S* ハプロタイプ程多くの標的配列を持つというモデル 2 である (Durand *et al.*, 2014)。

## 第2章 *Arabidopsis lyrata*に見られる優劣性制御機構の解明

### 2-1 序

第1章において、*B. rapa*における複雑な優劣性が僅か2つの低分子RNAとその標的の配列多型性によって制御されることを明らかにした。しかし、フランスのリール第1大学の研究グループは自家不和合性アブラナ科植物 *A. halleri*における優劣性の研究から、多数の低分子RNAとその標的により優劣性が制御されるというモデルを提唱した (Durand *et al.*, 2014)。

Durandらが研究対象として扱った *A. halleri*に近縁のアブラナ科自家不和合性植物 *A. lyrata*の花粉因子においても *S*ハプロタイプ間で複雑な優劣性の存在が示唆されている [Class-IV ( $S_{39}, S_{20}, S_{50}$ ) > Class-III ( $S_{13}, S_{16}$ ) > Class-II ( $S_{18}, S_{14}$ ) > Class-I ( $S_1$ )] (Prigoda *et al.*, 2005, Guo *et al.*, 2011, Goubet *et al.*, 2012)。しかしながら、この優劣性を制御する機構に関しては全く不明であった。

そこで本章においては、初めに *A. lyrata*における花粉因子対立遺伝子間の優劣性制御に低分子RNAが関与するかどうかを検討した。更に、その機構について詳細に調べ、特に低分子RNAとその標的の配列多型性により優劣性が制御されるかを検証した。

## 2-2 材料及び方法

### 植物材料

本研究では植物材料として、京都産業大学河邊昭准教授より分与して頂いた *A. lyrata*  $S_{13}$  ホモ系統と、東北大学高田美信博士により分与して頂いた  $S_{20}$  ハプロタイプを持つ *A. lyrata* 個体を用いた。23°C、14 時間明期、10 時間暗期の条件下で栽培した。

### *A. lyrata* における $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子の発現挙動解析

*A. lyrata* における葍発達ステージは *B. rapa* と同様に蕾の長径を測定し、ステージ 1: <1 mm、ステージ 2: 1-2 mm、ステージ 3: 2-3 mm、ステージ 4: 3-4 mm、ステージ 5: 開花前日、に分けた。 $S_{20}S_{13}$  ヘテロ個体、 $S_{13}S_{13}$  ホモ個体の各ステージの蕾から葍を取り出し、第 1 章のとおり、RNA 抽出、定量 PCR を行った。内部標準としては *Elf1 $\alpha$*  を用いた。用いたプライマーは Table S1 に示す。

### 低分子 RNA シーケンス解析

*A. lyrata*  $S_{20}S_{13}$  ヘテロ個体の葍ステージ 1、2 の蕾から葍を取り出し、*mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて total RNA を抽出した。シーケンス用ライブラリー調整、Illumina HiSeq シーケンス、アダプタートリミングは北海道システムサイエンス株式会社に委託した。得られたシーケンスリードは *bowtie* プログラムを用いて、 $S_{20}$  ハプロタイプと  $S_{13}$  ハプロタイプのゲノム配列 (HQ379628、ADBK01001387) に以下のパラメータでマッピングした。  
[-v 2/ -a/ --best/ --strata/ -m 20]

### *SP11* 遺伝子領域と高い相同性を示す逆位反復配列の探索

*SP11* 遺伝子と相同性の高い逆位反復配列の探索にはデータベースに登録されている  $S_{20}$ 、 $S_{39}$  (KJ772415—KJ772419)、 $S_{50}$  (HQ379631)、 $S_{13}$ 、 $S_{16}$  (HQ379629)、 $S_{14}$  (KJ772405—

KJ772407)、 $S_{18}$  (KJ772408—KJ772414)、 $S_1$  (KJ772401—KJ772404) ハプロタイプのゲノム領域の塩基配列を用いて解析した。

各  $SP11$  遺伝子の翻訳開始点の 500 bp 上流から終止コドンの 500 bp 下流までの配列を 30 bp ずつオーバーラップした 500 bp の断片にフラグメント化し、500 bp のフラグメント配列をクエリーとして、 $S_{20}$ 、 $S_{13}$  ハプロタイプのゲノム領域に対して BLAST 検索を行った。 $E$ -value が  $10^{-3}$  以下の配列を選び出し、RNAfold プログラムを用いて二次構造の予測を行い、 $-30 \text{ kcal mol}^{-1}$  以下の低いエネルギーを持つ逆位反復配列を選抜した。さらに、 $S_{20}S_{13}$  ヘテロ個体低分子 RNA リードを *bowtie* プログラム (Langmead *et al.*, 2009) を用いて、各逆位反復配列に完全一致する配列のみをマッピングし、少なくとも 5 種類の低分子 RNA がマッピングされる逆位反復配列のみを選び出した。得られた逆位反復配列は、FASTA 検索によって他の  $S$  ハプロタイプにも存在するかどうか調べた。高い相同性を示した領域に対しては RNAfold プログラムを用いて二次構造予測を行った。

## 2-3 結果

### *A. lyrata* における $S_{20} > S_{13}$ 間の優劣性の検証

アブラナ科自家不和合性植物 *A. lyrata* においても *B. rapa* と同様に優劣性の現象が確認されている (Prigoda *et al.*, 2005)。 $S_{20}$  ハプロタイプと  $S_{13}$  ハプロタイプ間の優劣性に関しては、 $S_{20}S_{13}$  ヘテロ体において劣性  $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子の発現が抑制されることがノーザンブロット解析、in situ hybridization 法により明らかになっており (Kusaba *et al.*, 2002)、低分子 RNA による優劣性制御機構の関与を検証するために  $S_{20}$ 、 $S_{13}$  ハプロタイプ間の優劣性を対象に研究を行うことにした。

まず、 $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子の葯発達ステージにおける発現パターンと  $S_{20}$ 、 $S_{13}$  ハプロタイプ間の優劣性を再確認するためにつぼみの長径の大きさごとにステージ分けをし (“材料と方法”参照) (Fig. 2-1 A)、 $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子の定量 PCR 解析を行った。その結果、 $S_{13}S_{13}$  ホモ個体において、 $S_{13}$ -*SP11* はステージ 2 (1–2 mm) から発現が始まり、ステージ 4 (3–4 mm) で発現が最大になることが分かった (Fig. 2-1 B)。また、 $S_{20}S_{13}$  ヘテロ個体においては  $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子の発現が約 100 分の 1 に抑制されており (Fig. 2-1 B)、 $S_{20}$ 、 $S_{13}$  ハプロタイプ間における優劣性関係が再確認された。

次に  $S_{20}$ 、 $S_{13}$  ハプロタイプ間における優劣性を制御する低分子 RNA を同定するために、 $S_{20}$  ハプロタイプのゲノム領域 (HQ379628) において  $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子 (ADBK01001387) の翻訳開始点の 500 bp 上流から終止コドンの 500 bp 下流までの配列と相同性の高い領域を探索した。その結果、 $S_{13}$ -*SP11* のイントロン領域と高い相同性を示す逆位反復配列 (*AI<sub>S</sub>SMI1*) を見出した (Fig. 2-2 A)。

$S_{20}$  ハプロタイプの *AI<sub>S</sub>SMI1* 領域から  $S_{13}$ -*SP11* と相同性の高い低分子 RNA が生産されているかどうかを調べるために、超並列シーケンサー解析を行った。 $S_{20}S_{13}$  ヘテロ個体において、 $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子が発現する以前のステージ 1 および発現が開始するステージ 2 の葯から RNA を抽出し (Fig. 2-1 B)、総リード数 44,553,252 の低分子 RNA シーケンスを得た。得られたシーケンスリードの内、10 リード以上確



認されたリードを  $S_{20}$ -*ALSMI1* 逆位反復配列にマッピングしたところ、本領域から  $S_{13}$ -*SP11* イントロン領域と相同性の高い 3 種類の低分子 RNA (*ALSmil*) の生産が有意に確認され、それぞれ *ALSmil-1*、*-2*、*-3* と命名した (Fig. 2-2 B)。*ALSmil-1*、*ALSmil-2* は 24 塩基、*ALSmil-3* は 21 塩基の低分子 RNA であり、それぞれ 100、30、608 リード得られた。3 種類の  $S_{20}$ -*ALSmil* と劣性  $S_{13}$ -*SP11* 遺伝子のイントロン領域に対して 21 塩基中 19 塩基以上の相同性と mispair score 3.0 以下の高い相同性を示していた (Fig. 2-3)。以上のことから、*ALSmil* が  $S_{20} > S_{13}$  間の優劣性を制御する低分子 RNA である可能性が考えられた。

### Class-IV > (Class-III、Class-II、Class-I) および Class-II > Class-I における優劣性を制御する低分子 RNA の探索

*A. lyrata* では各  $S$  ハプロタイプは大きく 4 つの Class に分けられ、[Class-IV ( $S_{39} = S_{20} = S_{50}$ ) > Class-III ( $S_{13} = S_{16}$ ) > Class-II ( $S_{18} = S_{14}$ ) > Class-I ( $S_1$ )] といった複雑な優劣性の存在が示唆されている (Prigoda *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2011; Goubet *et al.*, 2012)。ここに示された  $S$  ハプロタイプのゲノム配列はデータベースに登録されており、それらの配列を後の解析に用いた。Class-III の  $S_{16}$  ハプロタイプ、Class-II の  $S_{14}$ 、 $S_{18}$  ハプロタイプ、Class-I の  $S_1$  ハプロタイプの *SP11* 遺伝子 ± 500 bp と相同性の高い領域を  $S_{20}$  ハプロタイプのゲノム領域から探索したところ、 $S_{20}$ -*ALSMI1* 領域のみが得られた。 $S_{20}$ -*ALSmil* は  $S_{16}$ 、 $S_{14}$ 、 $S_{18}$ 、 $S_1$ -*SP11* 遺伝子のイントロンに対して 21 塩基中 18 塩基以上の配列相同性を示しており、かつ 4.0 以下の mispair score を示していた (Fig. 2-4 A, B)。

$S_{20}$ -*ALSMI1* 逆位反復配列の配列を基にして他の Class-IV の  $S_{39}$ 、 $S_{50}$  ハプロタイプのゲノム領域から *ALSMI1* 逆位反復配列を探索したところ  $S_{39}$ 、 $S_{50}$  ハプロタイプのゲノム領域にも *ALSMI1* 配列の存在が確認され stem-loop 構造を維持していた (Fig. 2-5)。 $S_{39}$ 、 $S_{50}$ -*ALSMI1* 配列内には前項で生産が確認された  $S_{20}$ -*ALSmil-1* と多型性を示す領域が存在していた (Fig. 2-6)。予測  $S_{39}$ 、 $S_{50}$ -*ALSmil-1* 配列は  $S_{20}$ -*ALSmil-1* と同様に自己よりも劣性ハプロタイプである  $S_{16}$ 、 $S_{14}$ 、 $S_{18}$ 、 $S_1$ -*SP11* 遺伝子のイントロンに対して 21 塩基中 18 塩基

以上の相同性を有しており、また、5.0以下の mispair score を示していた (Fig. 2-4 B)。

*ALSMI1* 逆位反復配列は Class-III の  $S_{13}$ 、 $S_{16}$ ハプロタイプや Class-II の  $S_{14}$ 、 $S_{18}$ ハプロタイプのゲノム領域にも存在していたが、 $S_{20}$ ハプロタイプから生産が確認された *ALSmI1* 領域の配列は保存されていなかった (Fig. 2-5, 6)。Class-III の  $S_{16}$ -*SMI1* 領域には、生産は確認されていないが、自己の  $S_{16}$ -*SP11* イントロンに対して mispair score 3.0 の高い相同性を示す配列が存在しており (Fig. 2-6)、自己の *SP11* の発現を抑制してしまうという矛盾が生じていた。同 Class-III の  $S_{13}$ -*SMI1* 逆位反復配列に  $S_{13}S_{20}$  葯超並列シーケンサー解析のリードをマッピングしたが低分子 RNA の生産は確認されず、機能していないことが考えられた (データ未掲載)。

一方、Class-II の  $S_{14}$ 、 $S_{18}$ -*ALSMI1* 逆位反復配列中には、自己より劣性のハプロタイプの  $S_1$ -*SP11* のエキソンジャンクションに対してのみ 21 塩基中 19 塩基の相同性、及び mispair score 3.0 の高い相同性を示す予測 *ALSmI1-4* 配列が存在しており (Fig. 2-6, 7 A, B)、未だ低分子 RNA の生産は確認されていないが、Class-II > Class-I 間の優劣性を制御している可能性が考えられた。

以上の結果から、Class-IV > (Class-III, Class-II, Class-I)、並びに Class-II > Class-I における優劣性は *ALSmI1* が自己よりも劣性  $S$ ハプロタイプの *SP11* に対してのみ高い相同性を示すことで制御される可能性が考えられた。

### Class-III > (Class-II, Class-I) における優劣性を制御する低分子 RNA の探索

前項で *ALSmI1* が Class-IV > (Class-III, Class-II, Class-I) 及び Class-II > Class-I における優劣性を制御する低分子 RNA である可能性を見出したが、Class-III の  $S_{13}$ -*ALSMI1* 逆位反復配列からは *ALSmI1* の生産が確認されず (データ未掲載)、*ALSmI1* では Class-III > (Class-II, Class-I) に見られる優劣性を説明することは出来ない。そこで Class-III > (Class-II, Class-I) 間の優劣性を制御しうる低分子 RNA の探索を試みた。前項と同様に、Class-II の  $S_{14}$ 、 $S_{18}$ ハプロタイプ、Class-I の  $S_1$ ハプロタイプの *SP11* 遺伝子± 500 bp と相同性

の高い領域を Class-III  $S_{13}$ ハプロタイプのゲノム領域から探索したところ、Class-II、Class-I  $SP11$  遺伝子の翻訳開始点の約 30 bp 上流に対して高い相同性を示す逆位反復配列 ( $AlSMI2$ ) が得られた (Fig. 2-8 A, C 2-9 A)。前項で得られた  $S_{20}S_{13}$ ヘテロ個体の葯由来低分子 RNA リードを  $S_{13}$ - $AlSMI2$  領域にマッピングしたところ、 $SP11$  遺伝子 5' 領域に対して高い相同性を示す低分子 RNA ( $AlSmi2$ ) が 2889 リード得られた (Fig. 2-8 B)。データベースを用いた解析より、 $AlSMI2$  逆位反復配列は Class-III の  $S_{13}$ ハプロタイプと  $S_{16}$ ハプロタイプにのみ確認された (Fig. 2-8 C, D)。 $AlSmi2$ は自己よりも劣性ハプロタイプである  $S_{14}$ -、 $S_{18}$ -、 $S_1$ - $SP11$ の 5' 領域に対して 21 塩基中 18 塩基以上の高い相同性を示しており、4.5 以下の mispair score を示していた (Fig. 2-9 A, B)。 $S_{13}$ - $AlSmi2$ は自己の  $SP11$  遺伝子 5' 領域に対して、21 塩基中 18 塩基の高い相同性を示していたが、第 1 章で有効性が見出された mispair score を用いると 6.5 という高い値を示しており (Fig. 2-9 B)、標的とはならないことが考えられ、*A. lyrata* の優劣性においても mispair score の有効性が見出された。以上のことから、Class-III > (Class-II、Class-I) の優劣性は  $AlSmi2$  が自己よりも劣性ハプロタイプの  $SP11$  に対して mispair score 4.5 以下の高い相同性を示すことで制御される可能性が考えられた。

## 2-4 考察

本章よりアブラナ科植物の自家不和合性植物である *A. lyrata* に見られる直線的な優劣性 [Class-IV ( $S_{39}, S_{20}, S_{50}$ ) > Class-III ( $S_{13}, S_{16}$ ) > Class-II ( $S_{18}, S_{14}$ ) > Class-I ( $S_1$ )] が *AlSmi1*、*AlSmi2* の 2 種類の低分子 RNA で制御される可能性を見出した (Fig. 2-10)。近年、フランスのリール第 1 大学の研究グループによって *Arabidopsis halleri* の直線的な優劣性 [( $S_{20} = S_{13}$ ) >  $S_{12} > S_4 > S_3 > S_1$ ] が複数の低分子 RNA によって制御されることが報告され (Durand *et al.*, 2014)、低分子 RNA による優劣性制御機構がアブラナ科の花粉側対立遺伝子間で普遍的に関与していることが明らかとなった。

*A. lyrata* の Class-IV > (Class-III, Class-II, Class-I) 間の優劣性、並びに Class-II > Class-I 間の優劣性を制御しうる *AlSMI1* は Durand らが同定した mirS3 に相当しており、一方、Class-III > (Class-II, Class-I) 間の優劣性を制御しうる *AlSMI2* についても mir1887 に相当していた (Durand *et al.*, 2014)。これらの低分子 RNA は *A. lyrata*、*A. halleri* に共通して優劣性制御に機能していると考えられる。

さらに、本章では *A. lyrata* における優劣性制御においても *B. rapa* と同様に低分子 RNA とその標的との mismatch score によって説明でき得ることを示した。各低分子 RNA は自己よりも劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* に対して mismatch score 5.0 以下の高い相同性を示しており (Fig. 2-10)、自己や自己よりも優性 *S* ハプロタイプの *SP11* に対しては 6.5 以上の mismatch score を示していた (Fig. 2-7 B, 9 B)。 *A. lyrata* においても以上のように、低分子 RNA とその標的の配列多型性によって優劣性が制御されうることが *B. rapa* で見出された “Polymorphic dominance modifier” モデルを強く示唆するものである。しかし、Class-III グループの  $S_{16}$ -*SMI1* 領域には自己の *SP11* と高い相同性を示す領域が存在しており (Fig. 2-6)、また、Class-II > Class-I 間の優劣性を制御しうる *AlSmi1-4* が生産されているかどうかは明らかではない (Fig. 2-7 B)。今後、次世代シーケンサー解析等でそれらの低分子 RNA 生産の有無を確認することで、低分子 RNA とその標的の多型性により相同性依存的に優劣性が制御されることを強く

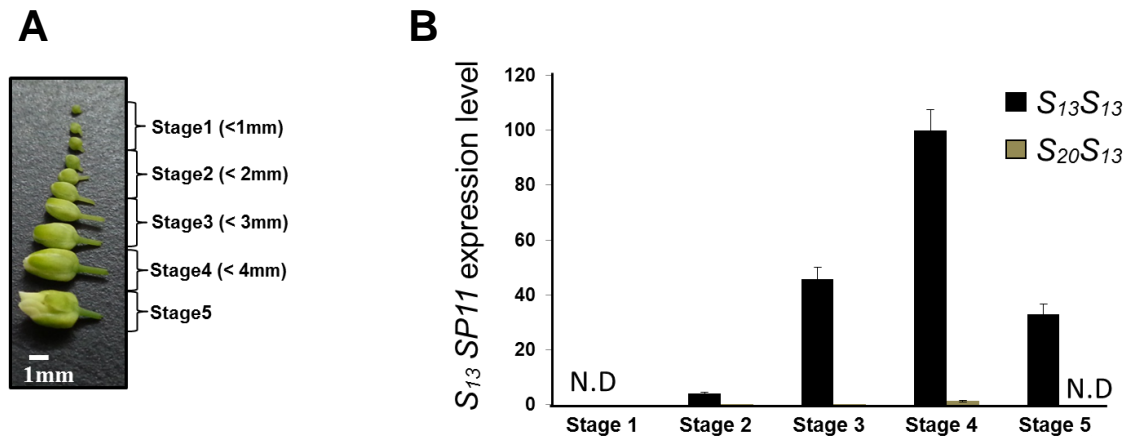
示唆できるものと考えられる。

これらアブラナ科植物における優劣性が、低分子 RNA を介した劣性 *SP11* 遺伝子のメチル化によって制御されているのか、劣性 *SP11* mRNA の切断によって制御されているのかは興味深い。一般的に 21 塩基や 22 塩基の低分子 RNA は標的 mRNA を切断し、24 塩基の低分子 RNA は標的の DNA メチル化を誘導することが知られている (Brodersen and Voinnet, 2006)。 *B. rapa* の *Smi* と *Smi2* は 24 塩基の低分子 RNA であり、実際に標的である *SP11* のプロモーター領域の DNA メチル化を誘導することが強く示唆されている (Tarutani *et al.*, 2010; 第 1 章)。本章で見出した Class-III > (Class-II, Class-I) 間の優劣性を制御しうる *AlSmi2* も 24 塩基の低分子 RNA が有意に生産されており、標的である劣性 *SP11* の 5' 領域のメチル化を誘導し、発現抑制を引き起こすことが予想される。一方で、Durand らは *A. halleri* における優劣性現象に 21 塩基の低分子 RNA の関与を予想しており、このことは標的 *SP11* の mRNA 分解により優劣性が制御されていることを示唆しているが、標的 *SP11* の mRNA が分解されているという証明はなされていない (Durand *et al.*, 2014)。本章で見出した Class-IV > (Class-III, Class-II, Class-I) 間の優劣性を制御しうる *AlSmi1* に関しては、*S<sub>20</sub>-AlSMI* 領域から劣性 *SP11* イントロンと相同性の高い 24 塩基の *AlSmi1-1*、*AlSmi1-2*、21 塩基の *AlSmi1-3* の 3 種類の *AlSmi1* バリエーションが有意に生成されており、DNA メチル化と mRNA 切断の両方の関与が予想される。今後 RACE 法や DNA のメチル化解析を行うことで、アブラナ科植物の花粉側対立遺伝子間の優劣性制御には DNA のメチル化のみが関与しているのか、もしくはメチル化と mRNA 分解の双方が関わる場合があるのかが明らかになると思われる。

第 1 章と本章で扱ったアブラナ科植物の花粉側対立遺伝子間で見られるような優劣性現象がどのように形成され得るかは非常に興味深い。1920 年代、優劣性の分子機構や進化に関しては集団遺伝学の祖と呼ばれた Fisher は対立遺伝子間の優劣性を制御する「ドミナンスモディファイヤー」の存在を提唱し、そのドミナンスモディファイヤーの進化の結果として優劣性現象が生まれるという説を唱えた

(Fisher, 1928)。しかしながら、その実態や存在の有無に関しては明らかになっていなかった。ドミナンスモディファイヤーは、対立遺伝子が長期的に生き残り、ヘテロ接合体が高頻度で維持され、優劣性が有利とされる際に進化すると考えられている (Billiard and Castric, 2011)。まさに、自家不和合性機構における *S* 決定因子は上記の条件を満たしている。例えば、まれな *S* 対立遺伝子を持つ花粉は集団内で不和合になる可能性が低くなるため有利になるという負の頻度依存淘汰のために集団内に対立遺伝子が維持される (Wright, 1939)。また、自家不和合性システムでは優劣性が生じていない場合、全ての個体において *S* 遺伝子座の遺伝子型はヘテロ接合であることが考えられる。さらに、氷河期など繁殖に不適切な環境下では優劣性により片側の対立遺伝子の表現型がマスクされるとその花粉は共優性の時と比べて、より多くの個体と交配できるようになり、繁殖に有利になることが考えられる。以上のことから、第 1 章および第 2 章の結果は優劣性が有利に働く条件下では低分子 RNA がドミナンスモディファイヤーとして進化してきたことを強く示唆するものである。

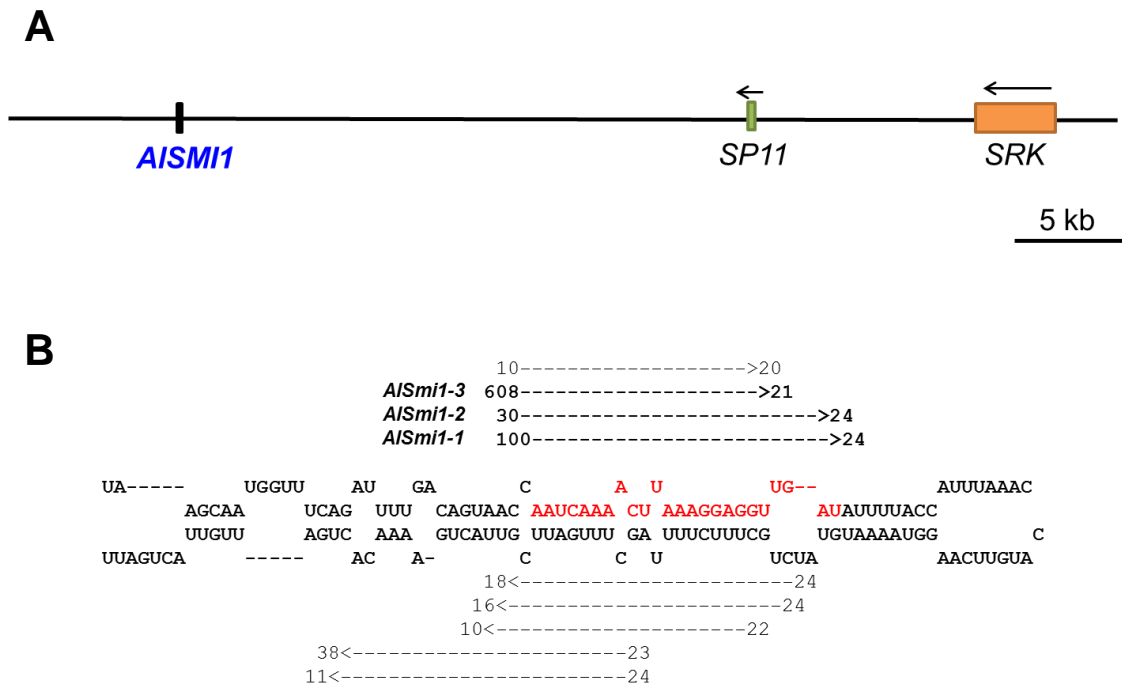
第 1 章および第 2 章では、アブラナ科植物における複雑な優劣性について報告したが、このような複雑な優劣性現象はキク科やヒルガオ科など他の自家不和合性植物にも見られる (Kowyama *et al.*, 1994; Brennan *et al.*, 2011)。また、植物に限らず、蝶の擬態遺伝子にも優劣性現象が報告されている (Joron *et al.*, 2006)。さらに、動植物において片側の対立遺伝子のみが発現している例は数多く報告されており (Guo *et al.*, 2004; Gimelbrant *et al.*, 2007; Zhuang and Adams, 2007; Wang *et al.*, 2007)、これらの優劣性現象や片側対立遺伝子発現についても、本研究において見出された低分子 RNA を介した標的との配列相同性依存的な制御機構が働いているかどうか、今後の研究の進展が期待される。



**Fig. 2-1.**  $S_{13}$ - $SP11$  の葯発達ステージにおける発現挙動と  $S_{20}$ - $S_{13}$  ハプロタイプ間の優劣性

(A) 葯発達ステージの分類。Stage 1: < 1mm、Stage 2: < 2 mm、Stage 3: < 3 mm、Stage 4: < 4 mm、Stage 5: 開花前日。

(B) 定量 PCR を用いて、 $S_{13}S_{13}$  株並びに  $S_{20}S_{13}$  株における  $S_{13}$ - $SP11$  の発現量解析を行った。内部標準には  $Elf1\alpha$  を用いた。“N. D.”は検出されなかったことを示す。

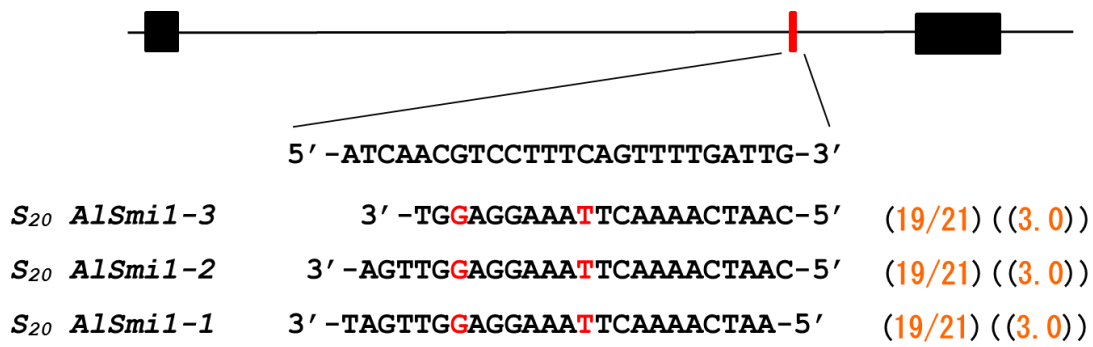


**Fig. 2-2.**  $S_{20}$  ハプロタイプの *AISMI1*

(A)  $S_{20}$  ハプロタイプのゲノム領域 (HQ379628) における *AISMI1* の位置。 *SP11*、*SRK* をそれぞれ緑、橙で表し、*AISMI1* を青で示した。

(B) 超並列シーケンサー解析による  $S_{20}$ -*AISMI1* 逆位反復配列からの低分子 RNA の発現解析。10 リード以上得られた低分子 RNA を  $S_{20}$ -*AISMI1* 逆位反復配列にマッピングした。矢印はマッピングされた低分子 RNA とその向きを表している。矢印の始点部分の数字は得られたリード数を、終点部分の数字は低分子 RNA の塩基長を示している。赤で示した塩基は 24 塩基長の *AISmi1-1* 領域を表している。





**Fig. 2-3.** *S*<sub>20</sub>-*ALSmi1* バリエントと *S*<sub>13</sub>-*SP11* イントロンとの相同性

*S*<sub>13</sub>-*SP11* 遺伝子領域を図示した。黒い四角は *S*<sub>13</sub>-*SP11* のエクソン領域を示している。*S*<sub>13</sub>-*SP11* とのミスマッチ塩基は赤で示した。括弧内の数値は 21 塩基中のマッチ塩基数を表し、2 重括弧内の数値は mispair score を表している。

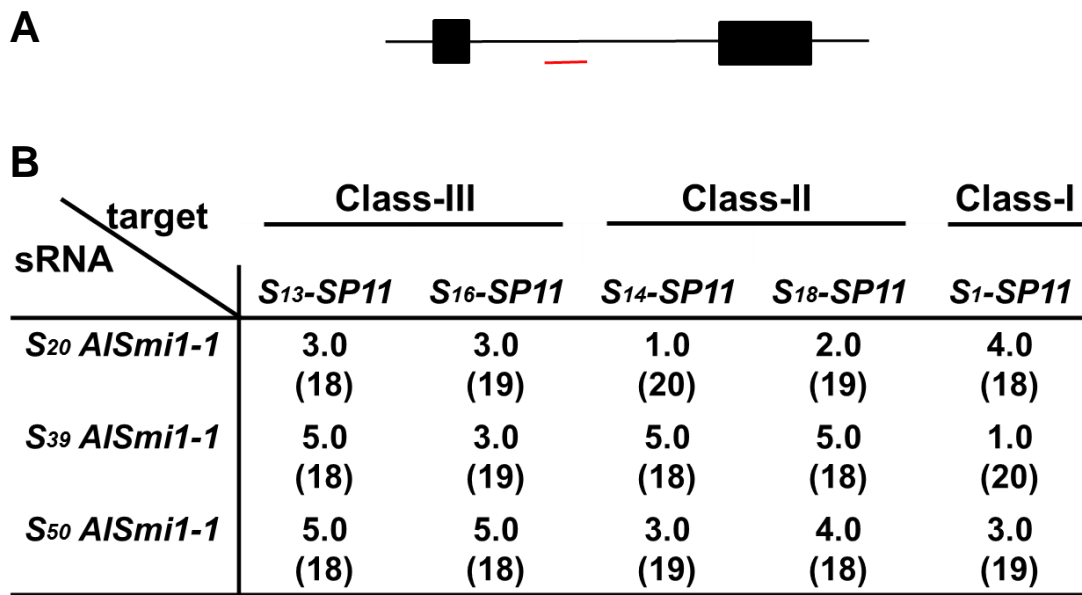


Fig. 2-4. Class-IV-*ALSmi1-1* と標的との相同性

(A) Class-III、II、I-*SP11* のゲノム領域を模式的に表した。黒い四角は *SP11* 遺伝子のエクソンを表しており、赤の下線は *ALSmi1-1* と相同性の高い領域を表している。

(B) Class-IV (*S*<sub>20</sub>, *S*<sub>39</sub>, *S*<sub>50</sub>) *ALSmi1-1* と Class-III、II、I-*SP11* との相同性。数値は mispair score を表しており、括弧内の数値は 21 塩基中のマッチ塩基数を示している。

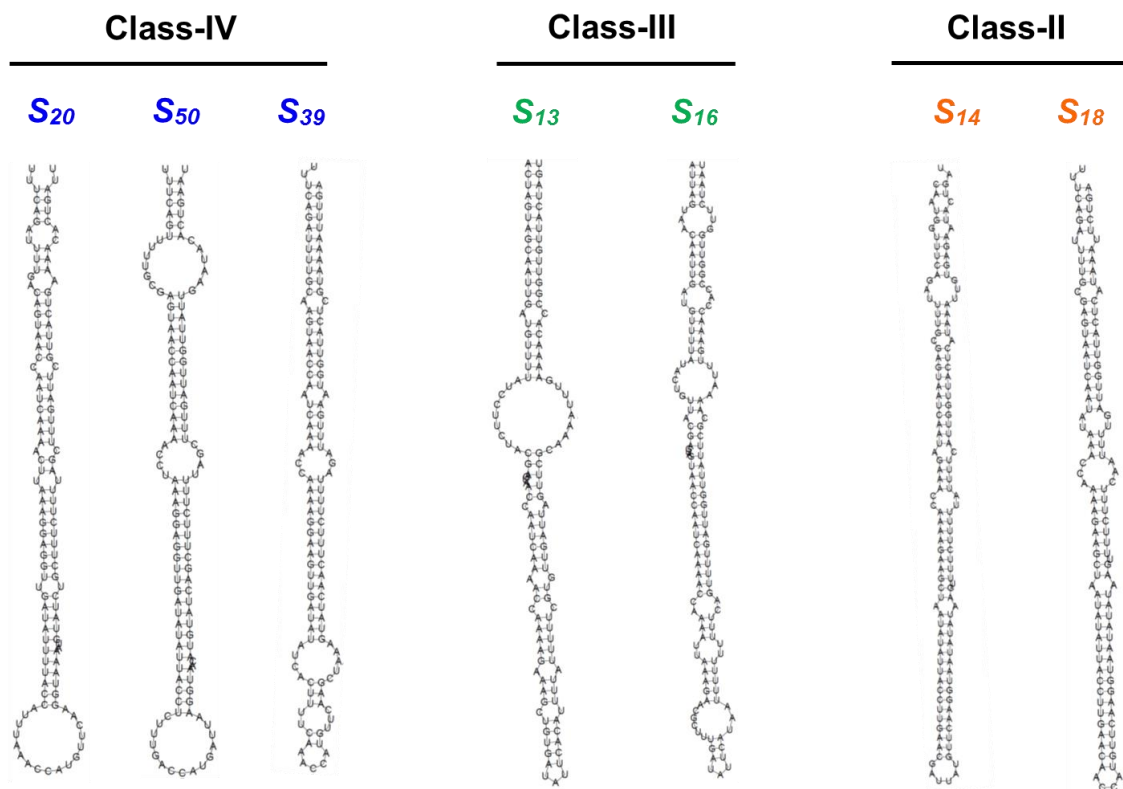


Fig. 2-5. *AIMMI1* の二次構造

*S*<sub>20</sub>、*S*<sub>50</sub>、*S*<sub>39</sub>、*S*<sub>13</sub>、*S*<sub>16</sub>、*S*<sub>14</sub>、*S*<sub>18</sub>ハプロタイプの *AIMMI1* の二次構造を RNAfold プログラムを用いて予測した。



Fig. 2-6. *AISMI1* 逆位反復配列のアライメント

*S*<sub>20</sub>、*S*<sub>50</sub>、*S*<sub>39</sub>、*S*<sub>13</sub>、*S*<sub>16</sub>、*S*<sub>14</sub>、*S*<sub>18</sub>ハプロタイプの *AISMI1* のアライメント。Class-IV の *AISmi1-1* 配列を赤の枠で示した。青の枠は予測 *AISmi1-4* 配列を示す。*S*<sub>16</sub>-*AISMI1* 領域において、自己の *SP11* と高い相同性を示す 24 塩基の配列を灰色の四角で示した。

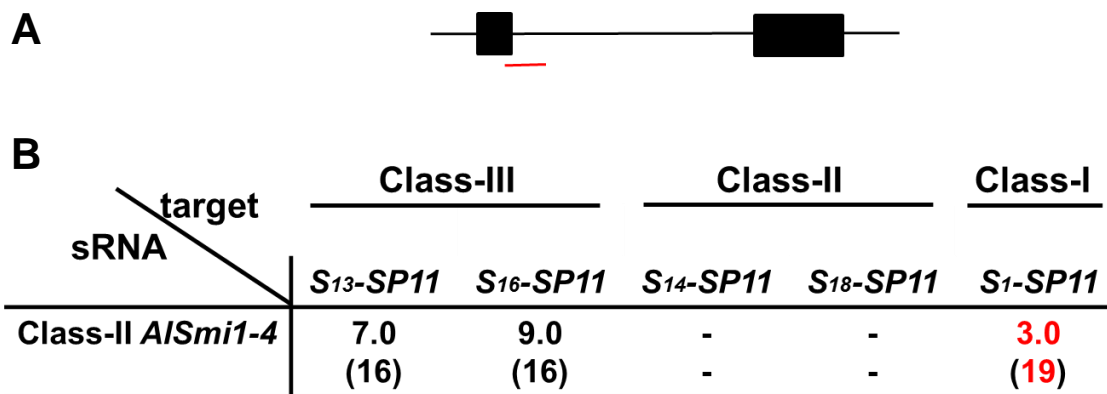


Fig. 2-7. 予測 Class-II *AlSmi1-4* 配列と標的との相同性

(A) Class-III、II、I-*SP11* のゲノム領域を模式的に表した。黒い四角は *SP11* のエクソンを表しており、赤の下線は *AlSmi1-4* と相同性の高い領域を表している。(B) Class-II *AlSmi1-4* と Class-III、II、I-*SP11* との相同性。数値は mispair score を表しており、括弧内の数値は 21 塩基中のマッチ塩基数を示している。

“-” は相同性が低かったことを示す。mispair score 5.5 以下、21 塩基中 18 塩基以上の相同性を示した場合を赤で示した。

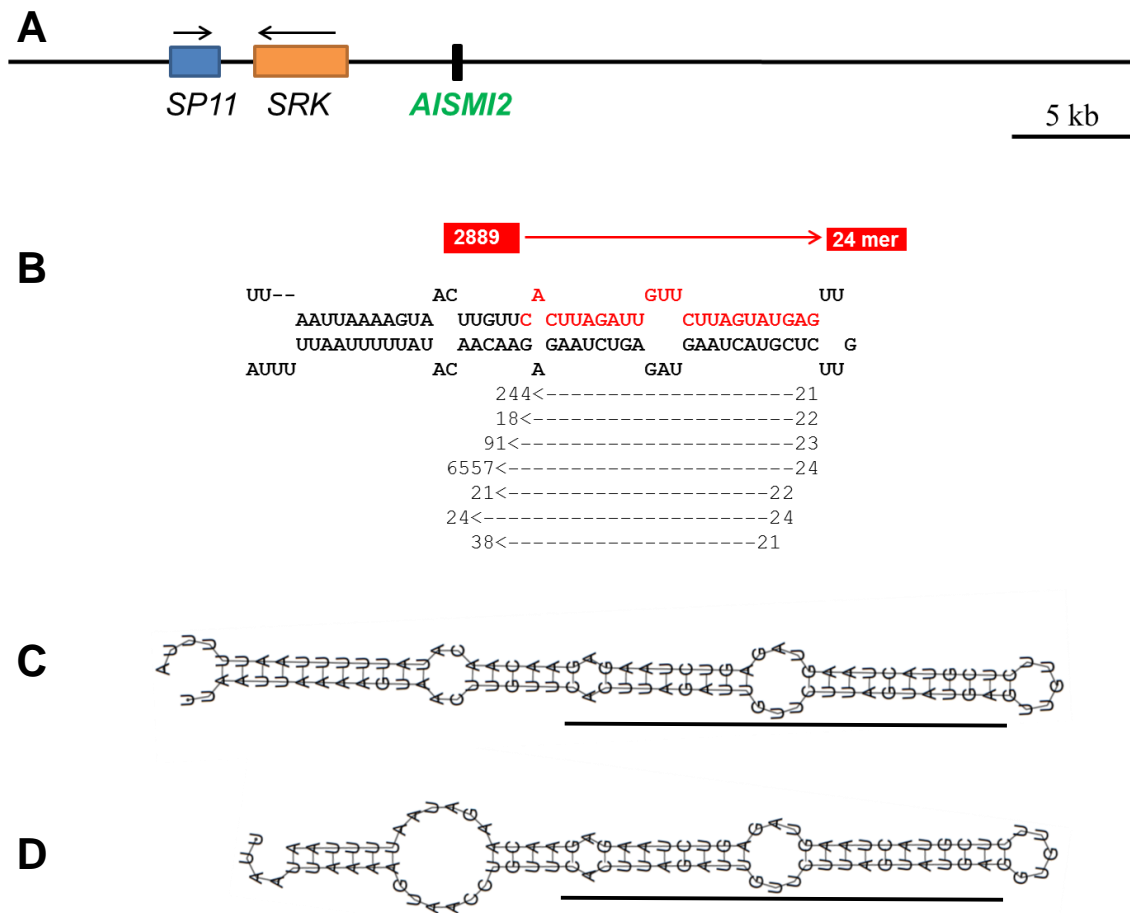


Fig. 2-8. *S*<sub>13</sub>ハプロタイプの *AISMI2* 配列

(A) *S*<sub>13</sub>ハプロタイプのゲノム領域 (ADBK01001387) における *AISMI2* の位置。 *SP11*、 *SRK* をそれぞれ青、 橙で表し、 *AISMI2* を緑で示した。

(B) 超並列シーケンサー解析による *S*<sub>13</sub>-*AISMI2* 逆位反復配列からの低分子 RNA の発現解析。 10 リード以上得られた低分子 RNA を *S*<sub>13</sub>-*AISMI2* 逆位反復配列にマッピングした。 矢印はマッピングされた低分子 RNA とその向きを表している。 矢印の始点部分の数字は得られたリード数を、 終点部分の数字は低分子 RNA の塩基長を示している。 赤で示した塩基は 24 塩基長の *AISmi2* 領域を表している

(C) *S*<sub>13</sub>-*AISMI2* の二次構造。 黒の下線は 24 塩基の *AISmi2* を示す。

(D) *S*<sub>16</sub>-*AISMI2* の二次構造。 黒の下線は 24 塩基の予測 *AISmi2* 配列を示す。

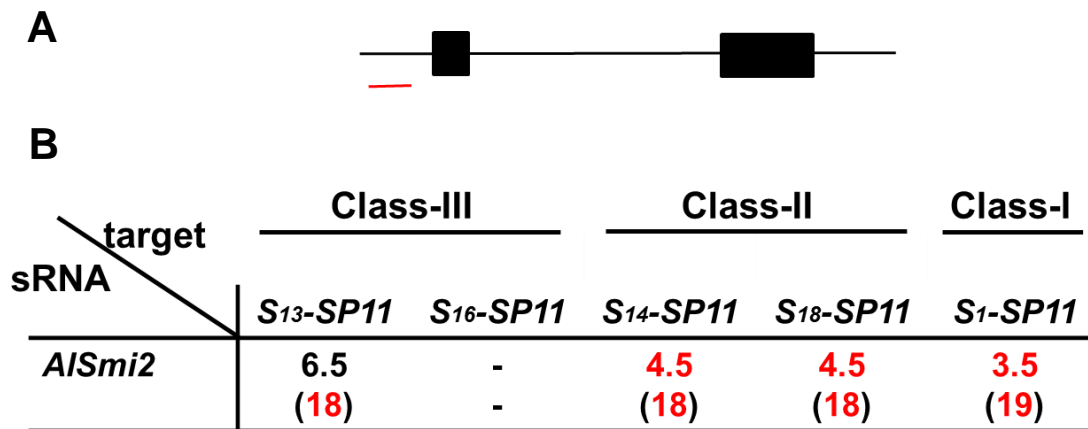


Fig. 2-9. Class-III *AISmi2* と標的との相同性

(A) Class-III、II、I-*SP11* のゲノム領域を模式的に表した。黒い四角は *SP11* のエクソンを表しており、赤の下線は *AISmi2* と相同性の高い領域を表している。(B) Class-II *AISmi2* と Class-III、II、I-*SP11* との相同性。数値は mispair score を表しており、括弧内の数値は 21 塩基中のマッチ塩基数を示している。

“-” は相同性が低かったことを示す。mispair score 5.5 以下、21 塩基中 18 塩基以上の相同性を示した場合を赤で示した。

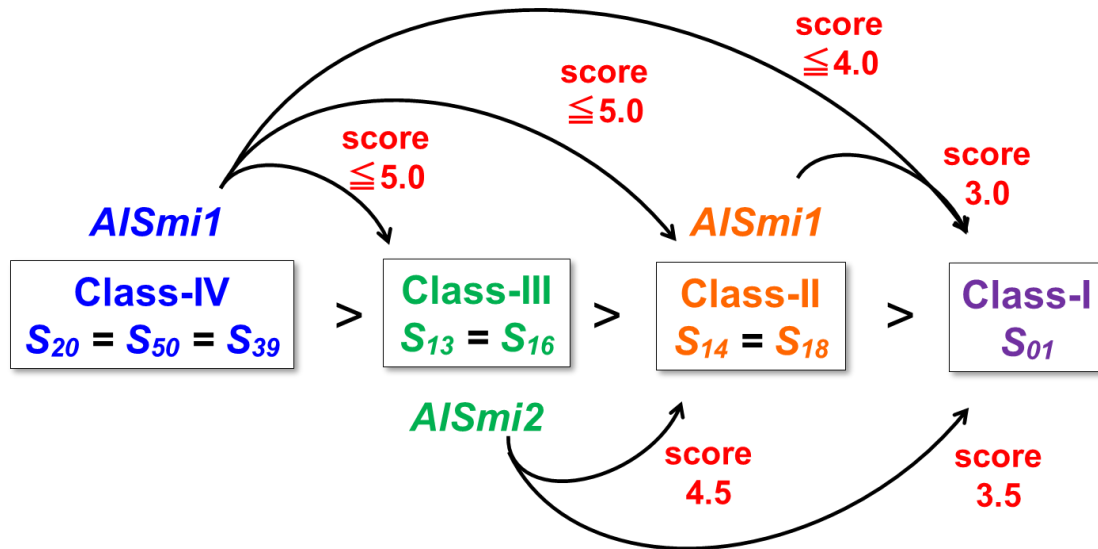


Fig. 2-10. *A. lyrata* の優劣性制御モデル

Class-IV > (Class-III, Class-II, Class-I)の優劣性と Class-II > Class-I の優劣性は *AISmi1* が、(Class-III > Class-II, Class-I) の優劣性は *AISmi2* が自己よりも劣性 *S*ハプロタイプの *SP11* に対して mispair score 5.0 以下の高い相同性を示すことで制御されている。



## 第 3 章 *Smi* を介した強力な遺伝子発現抑制機構の解明

### 3-1 序

序論で示したように、*B. rapa* の *Smi* は標的劣性 *SP11* の発現を数万分の 1 にまで強く抑制する。例えば、レトロトランスポゾンである *AtSN1* は DNA メチル化因子の変異体において発現が十数倍程度回復し (Wu *et al.*, 2012)、また、イネにおいては miRNA が標的遺伝子のメチル化を誘導することで 2—6 分の 1 の発現抑制を引き起こすことが示唆されている (Wu *et al.*, 2010)。これらの例と比べると、*Smi* による標的 *SP11* の発現抑制は極めて強力であるが、しかしながら、この強力な遺伝子発現抑制の詳細なメカニズムはわかっていなかった。本研究室ではこれまでに、*Smi* 依存的な DNA メチル化と *SP11* の発現抑制のメカニズムの解明を目的として、同じアブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて本優劣性を再現する実験系の確立が進められてきた。

Class-II *SP11* 遺伝子の 5' 領域には bZIP 型の転写因子の予測結合サイトが存在しており (region A)、Class-I *S* ハプロタイプ共存下で DNA の高メチル化が確認されている (Shiba *et al.*, 2006; Fig. 1-2 A)。さらに region A の周辺には同様に Class-I *S* ハプロタイプ共存下で高メチル化が確認され、Class-II 間で高度に保存されている領域も存在している (region B)(Shiba *et al.*, 2006; Fig. 1-2 A)。これら region A、region B はそれぞれ *Smi2*、*Smi* による標的サイトと一致しており (Fig. 1-2 A)、以上の領域を含む Class-II *S<sub>60</sub>-SP11* プロモーター (翻訳開始点上流 0.43 kb) に *GUS* 遺伝子を連結させたコンストラクト (*S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS*) をシロイヌナズナに導入した場合、葯において特異的に *GUS* の発現が確認され、region A や B を欠損させたコンストラクトでは *GUS* の発現が見られなくなっている (Shiba *et al.*, 2006)。これらのことから region A、B が *SP11* の葯における発現に重要な領域であり、*Smi* による *SP11* 発現抑制に関わるシス配列であることが示唆されていた。

本研究室では、*S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS* を導入したシロイヌナズナに、*B. rapa* において Class-II *SP11* の発現抑制を誘導した Class-I *S<sub>9</sub>-SMI* ゲノム領域が交配により導入されたが、*GUS* の発現抑制は確

認められなかった (三浦・樽谷, 未発表)。導入 *B. rapa S<sub>9</sub>-Smi* が *A. thaliana* において適切ではない時期に発現している可能性が考えられ、蒞の早期ステージで強発現する *Osg6B* プロモーターに Class-I *S<sub>52</sub>-SMI* 逆位反復配列を繋げたコンストラクトが交配により導入された結果、*GUS* の発現抑制が認められたが、*B. rapa* で見られるほどの強い発現抑制は認められなかった (三浦, 未発表)。このことから、発現抑制を受ける側の *SP11* の導入遺伝子領域が翻訳開始点上流 0.43 kb では不十分である可能性が考えられた。

本章では *Smi* による劣性 *SP11* 遺伝子の強力な発現抑制のメカニズムの解明を目的として、発現抑制を受ける *SP11* 遺伝子のシス配列の同定を試みた。そこで劣性 Class-II *SP11* 遺伝子の約 1.2 kb 上流に存在するプロモーター領域と相同性の高い 3 回繰り返し配列 (REP) に着目し、本遺伝子発現抑制への関与を検証した。

## 3-2 材料及び方法

### 植物材料

アブラナ科植物 *B. rapa* の形質転換には「おそめ」 ( $S_{52}S_{60}$ ) をタキイ種苗株式会社から取り寄せ使用した。

### バイサルファイト処理による DNA のメチル化解析

*B. rapa* の  $S_{60}S_{52}$ ヘテロ個体、 $S_{60}S_{60}$ ホモ個体の葯タペート組織のゲノム DNA の抽出、並びにバイサルファイト処理は第 1 章に記述した方法で行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型として  $S_{60}$ -*SP11* プロモーター、REP 領域、 $S_{60}$ -*SP11* プロモーターと REP 間の領域特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行った (Table S1)。

### アブラナ形質転換体の作成

アブラナの形質転換は Takasaki らの方法 (Takasaki *et al.*, 1997) を一部改変して行った。

#### (1) アブラナ種子の滅菌・播種

アブラナの栽培品種の「おそめ」 (タキイ種苗株式会社) の種子をミラクロス (Calbiochem) に包み、70%エタノールを入れたファルコンチューブ内で 1 分間洗浄した。滅菌水で洗浄後、Tween-20 を数滴加えた 20%アンチホルミン溶液に 20 分間浸し、滅菌を行った。その後、滅菌水で 3 度洗浄した後、1/10 修正 MS 培地 (0.1 × Murashige and Skoog plant salt mixture (日本製薬)、50 µg/L Pymidine HCl、50 µg/L Nicotinic acid、200 µg/L Glycine、6 g/L agar、pH5.8) を入れたアグリポットに滅菌種子を播種した。胚軸が伸びやすいようにアグリポットにキムタオルを被せ 25°C、16 時間日長下で 1 週間生育させた。

#### (2) アグロバクテリウム感染液の調製

REP 領域を含む  $S_{60}$ -*SP11* プロモーター (1950 bp) : *GUS/pBI121* ( $S_{60}$ -*SP11* long pro::*GUS*) バイナリーベクターおよび REP 領域を含まない  $S_{60}$ -*SP11* プロモーター (580 bp) : *GUS/pBI121* ( $S_{60}$ -*SP11*

short pro::GUS) ベクターは当研究室樽谷、柴らにより作製されていたので、これらを使用することにした。各植物形質転換用プラスミドを、凍結した *Agrobacterium tumefaciens* pMP90 へ添加し、37°C 5 min ヒートショック後、氷上で 2 min 静置し、1 mL SOC を添加、28°C 180 rpm 2 hr 回復培養を行った後、50 µg/l カナマイシンを含むプレートに播き、シングルコロニーを取得した。得られたシングルコロニーを液体 LB 培地 (50 µg/L カナマイシン、15 µg/ml ゲンタマイシン) に植菌し、200 rpm、28°C で一晩培養した。OD<sub>680</sub> = 0.5 に達した培養液 1 mL を共存培養液体培地 [0.1 ×Murashige and Skoog plant salt mixture、0.1 g/L myo-Inositol、1.3 mg/L Thiamin HCl、200 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mg/L 2,4-D、30 g/L Sucrose、6 g/L agar、pH5.2] 14 mL に加え、acetosyringone (100 mg/mL) を 15 µl 加えた。この液を感染液とした

### (3) 胚軸の切り出し

播種後 7 日目の実生から胚軸をメスで切り出し、5-10 mm の胚軸片を共存培養固体培地 (pH 5.8) 上に並べた。シャーレをアルミホイルで覆い、25°C で 24 時間前培養した。

### (4) アグロバクテリウムの感染

シャーレに (2) で用意した感染液 15 ml を入れ、(3) で前培養していた胚軸片を感染液に浸し、40 rpm で 10 分間振盪した。前培養に用いていた共存培養固体培地上に 4 日前に継代したタバコ培養細胞 1.5 ml を均一に分散させ、その上に滅菌した濾紙を敷き、余分な感染液を濾紙で十分に取り除いた胚軸片を並べた。シャーレをアルミホイルで包み、25 °C で 3 日間共培養した。

### (5) カルスの誘導

共培養した胚軸片をカルス誘導培地 (1×Gamborg's B5 Medium Salt Mixture (日本製薬)、0.1 g/L myo-inositol、0.01 g/L Thiamine HCl、100 mg/L Nicotinic acid、100 mg/L pyridoxine HCl、1 mg/L 2,4-D、30 g/L Sucrose、6 g/L agar、50 mg/L Meropenem Hydrate、6 g/L agar、pH 5.8) に移植した。25°C、16 時間日長下で 1 週間培養した。

### (6) 不定芽の誘導

不定芽誘導培地 (1×Gamborg's B5 Medium Salt Mixture (日本製薬)、0.1 g/L myo-inositol、0.01 g/L Thiamine HCl、100 mg/L

Nicotinic acid、100 mg/L pyridoxine HCl、3 mg/L 6-Benzylaminopurine、1 mg/L *trans*-Zeatin-9-riboside、10 mg/L Kanamycin、50 mg/L Meropenem Hydrate、6 g/L agar、pH 5.8) に胚軸片を移し、14日間、25℃、16時間日長下で培養し不定芽を誘導した。不定芽が出るまで2週間毎に不定芽誘導培地に継代を繰り返した。

#### (7) 不定根の誘導

成熟した不定芽からメスを用いてカルスを取り除き、発根培地 (1×Gamborg's B5 Medium Salt Mixture (日本製薬)、0.1 g/L myo-inositol、0.01 g/L Thiamine HCl、100 mg/L Nicotinic acid、100 mg/L pyridoxine HCl、10 g/L sucrose、2 mg/L IBA、50 mg/L Kanamycin、50 mg/L Meropenem Hydrate、2 g/L Phytigel、pH 5.8) に移植した、25℃、16時間日長下で培養し不定根を誘導した。不定根が十分に誘導されたら、水で1000倍に薄めたハイポネックスを加えてオートクレーブしたフロリアライトに移植して25℃、16時間日長下で培養した。

#### (8) 順化

十分発根した幼植物を黒ポットに移植した。湿度を保つため、植物体にはビニール袋を掛けておき、移植後約3日目から少しずつ穴を開けていき、最終的にビニール袋を取った。

### GUS 染色

*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>/S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS*、*S<sub>60</sub>S<sub>60</sub>/S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS*、*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>/S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS*、*S<sub>60</sub>S<sub>60</sub>/S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS* 個体の発達ステージ3の莖を取り出し、ピンセットを用いてがくを剥いた。その後エッペンチューブに入れた90%アセトン溶液に浸し、軽くボルテックスした後、氷上で15 min 静置した。90%アセトン溶液を除去し、GUS 染色液 [100 mM Sodium Phosphate Buffer、0.1 % Triton X-100、10 mM EDTA、5 mM potassium ferricyanide、5 mM potassium ferrocyanide、0.5 mg/ml X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)] を加え、遮光し、37℃で17時間インキュベートした。その後、70%エタノールで脱色し、GUS の染色を観察した。

## 定量 PCR による発現解析

*SP11* 遺伝子および *SAN2* 遺伝子の定量 PCR に使用する total RNA は *B. rapa* の *S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>* ヘテロ個体、*S<sub>60</sub>S<sub>60</sub>* ホモ個体の発達ステージ 5 の蒴を取り出し、抽出した。Total RNA の抽出、定量 PCR は第 1 章に記述した方法で行った。*SAN2* 遺伝子の定量は *SAN2* (AB102679) に特異的なプライマーを用いた (Table S1)。

*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>/S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS*、*S<sub>60</sub>S<sub>60</sub>/ S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS*、*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>/ S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS*、*S<sub>60</sub>S<sub>60</sub>/ S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS* 個体における *SP11* 遺伝子および導入 *GUS* 遺伝子の定量 PCR に使用する total RNA に関しても発達ステージ 5 の蒴からサンプリングを行った。

### 3-3 結果

#### Class-I *S*ハプロタイプ共存下における *S*<sub>60</sub>-*SP11* 遺伝子 1.2 kb 上流の繰り返し配列 (REP) のメチル化の変化

Class-II *S*ハプロタイプの *SP11* 遺伝子の翻訳開始点から約 1.2 kb 上流には繰り返し配列 (REP) の存在が確認されている (Kakizaki *et al.*, 2006; Fig. 3-1 A)。REP 領域は 64 bp の配列が 3 回繰り返されており、5'側から REP-A、REP-B、REP-C と並んでおり、REP-C は *SP11* プロモーターと高い相同性を示している (Kakizaki *et al.*, 2006; Fig. 3-1 B)。Class-I の *Smi* は *S*<sub>60</sub>-REP-C 以外の各 REP に対して mispair score 6.0 以下の値を示しており、少なくとも全ての Class-II *S*ハプロタイプの REP-A に対しては 5.0 以下の mispair score の値を示しており (Fig. 3-2 A-D)、*Smi* によるメチル化のターゲットとなる可能性が考えられた。そこで、バイサルファイト PCR 法により Class-I/Class-II ヘテロ個体における REP 領域のメチル化を解析した。*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>ヘテロ個体 (*S*<sub>52</sub> > *S*<sub>60</sub>)、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>ホモ個体からタペート組織を抽出し、それぞれ REP 領域のメチル化を解析したところ、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>ホモ個体においては *SP11* プロモーター、REP 領域のメチル化は確認されなかったが、*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>ヘテロ個体においては *SP11* プロモーターと REP 領域のメチル化が確認された (Fig. 3-3 A, B)。*SP11* プロモーターと REP 間の領域も同様にバイサルファイト PCR 法によりメチル化度合いを解析したが、*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub> 個体共に DNA のメチル化は確認されなかった (Fig. 3-3 C)。

REP 領域においても Class-I *S*ハプロタイプ共存下でのみメチル化が確認されたため、本 REP 領域が Class-II *SP11* 発現抑制に関与している可能性が考えられた。

#### 劣性 *S*<sub>60</sub>-*SP11* 遺伝子 1.7 kb 上流に存在する *SAN* 遺伝子の発現変化

*S*<sub>60</sub>ハプロタイプにおいては REP 領域の約 300 bp 上流にノンコーディング RNA である *SAN* 遺伝子 (*S* locus *A*nther-expressed *N*on-coding RNA like) の存在が報告されている (Fukai *et al.*, 2003; Fig.

3-1)。*SAN* 遺伝子は蒞でのみ発現が確認されており、*SAN* 遺伝子領域からは *SAN1*、*SAN2* という大きく分けて 2 種類の転写産物が生産される (Fukai *et al.*, 2003)。前項において Class-I/Class-II ヘテロ個体における REP 領域のメチル化が確認されたため、その上流に位置する *SAN* 遺伝子の発現も Class-I ハプロタイプ共存下で影響を受けている可能性が考えられた。そこで、Class-I/Class-II ヘテロ個体において *SAN* 遺伝子の発現が変化するかどうかを定量 PCR により解析した。その結果、*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub> ヘテロ個体では、*SAN2* 遺伝子の発現が *S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub> ホモ個体に比べて数百分の 1 程度抑制されていることが明らかとなった (Fig. 3-4)。以上の結果から、*Smi* による発現抑制が *SP11* のみならず上流 1.7 kb の *SAN* を含む広範囲に及ぶと考えられた。

### 形質転換実験による *SP11* 遺伝子発現抑制における REP の関与の検証

REP 領域が Class-I *S* ハプロタイプ共存下でメチル化され、その上流に存在する *SAN* 遺伝子も発現抑制を受けることから、*SP11* の発現抑制には REP 領域を含む広範囲のゲノム領域が重要であることが示唆された。そこで *SP11* の発現抑制における REP 領域の重要性を検証するため、REP 領域を含まない *S*<sub>60</sub>-*SP11* プロモーター (翻訳開始点上流 0.58 kb) に *GUS* 遺伝子を連結させたコンストラクト (*S*<sub>60</sub>-*SP11* short pro::*GUS*) 及び REP 領域を含む *S*<sub>60</sub>-*SP11* プロモーター (翻訳開始点上流 1.95 kb) に *GUS* 遺伝子を連結させたコンストラクト (*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS*) を *B. rapa* の栽培品種「おそめ」(*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>) に導入し、*S*<sub>60</sub>-*SP11* short pro::*GUS* 個体を 3 株 (Short2、Short13-2、Short16-1)、*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS* 個体を 3 株取得することに成功した (Long16-2、Long32、Long34-1)。その後、それらの形質転換個体と *S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub> ホモ個体を交配することで *S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS* 個体、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS* 個体、*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* short pro::*GUS* 個体、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* short pro::*GUS* 個体を得た。得られた形質転換体における *GUS* 活性を確認するために *GUS* 染色を行ったところ、*S*<sub>60</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS* 個体では蒞において特異的に *GUS* 染色が確認されたが、*S*<sub>52</sub>*S*<sub>60</sub>/*S*<sub>60</sub>-*SP11* long pro::*GUS* 個体では *GUS* 染色が確認されなかった (Fig. 3-5)。ま



た、定量 PCR の結果、内在性の *SP11* 遺伝子の数万分の 1 という発現抑制には及ばないが、*S<sub>60</sub>S<sub>60l</sub> S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS* 個体に比べて *S<sub>52</sub>S<sub>60l</sub> S<sub>60</sub>-SP11 long pro::GUS* 個体における *GUS* 遺伝子の発現が約 300 分の 1 以下に強く抑制されていた (Fig. 3-7 A)。一方、*S<sub>52</sub>S<sub>60l</sub> S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS* 個体においては弱いながらも *GUS* 染色が確認された (Fig. 3-6)。定量 PCR 解析においても *S<sub>60</sub>S<sub>60l</sub> S<sub>60</sub>-SP11 short pro::GUS* 個体に比べて 5—70 分の 1 程度の弱い *GUS* 遺伝子の発現抑制しか確認されなかった (Fig. 3-7 B)。以上の結果から、*Smi* による Class-II *SP11* の強力な発現抑制には REP を含む広範囲のゲノム構造が関与することが示唆された。

### 3-4 考察

本章により、*Smi*による Class-II *SP11* 対立遺伝子の強力な発現抑制には約 1.2 kb 上流の繰り返し配列 (REP) を含む比較的広範囲のゲノム領域のエピジェネティック制御が重要であることが強く示唆された。

Class-I *Smi*は Class-II *SP11*プロモーターのみならず REP に対しても高い相同性を示しており、少なくとも全ての Class-II *S*ハプロタイプの REP-A に対しては mispair score 5.0 以下の高い相同性を示していた。実際に *S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>*ヘテロ個体では ( $S_{52} > S_{60}$ )、REP 領域においても DNA のメチル化が確認された (Fig. 3-3 B)。RNA による DNA メチル化経路 [RdDM (RNA-directed DNA methylation) 経路] では DNA のメチル化が広がることが報告されており (Matzke *et al.*, 2009)、*SP11*プロモーターのメチル化が REP 領域まで広がった可能性も考えられたが、プロモーターと REP 間の領域には DNA のメチル化は確認されず (Fig. 3-3 C)、プロモーターと REP の DNA メチル化が独立に起きたことが考えられた。

*S<sub>60</sub>*ハプロタイプにおいて、REP 領域の 300 bp 上流に存在する *SAN* 遺伝子はノンコーディング RNA をコードしており、薬でのみ発現が誘導されるが、その機能に関しては分かっていない (Fukai *et al.*, 2003)。今回、*S<sub>52</sub>S<sub>60</sub>*ヘテロ個体では *SP11*のみならず、その *SAN* 遺伝子の発現も強く抑制されていた。これは REP 領域付近に *SAN* 遺伝子のシス配列が存在しており、その領域が DNA メチル化を受けることで、転写不活性の状態になってしまったためではないかと考えられる。

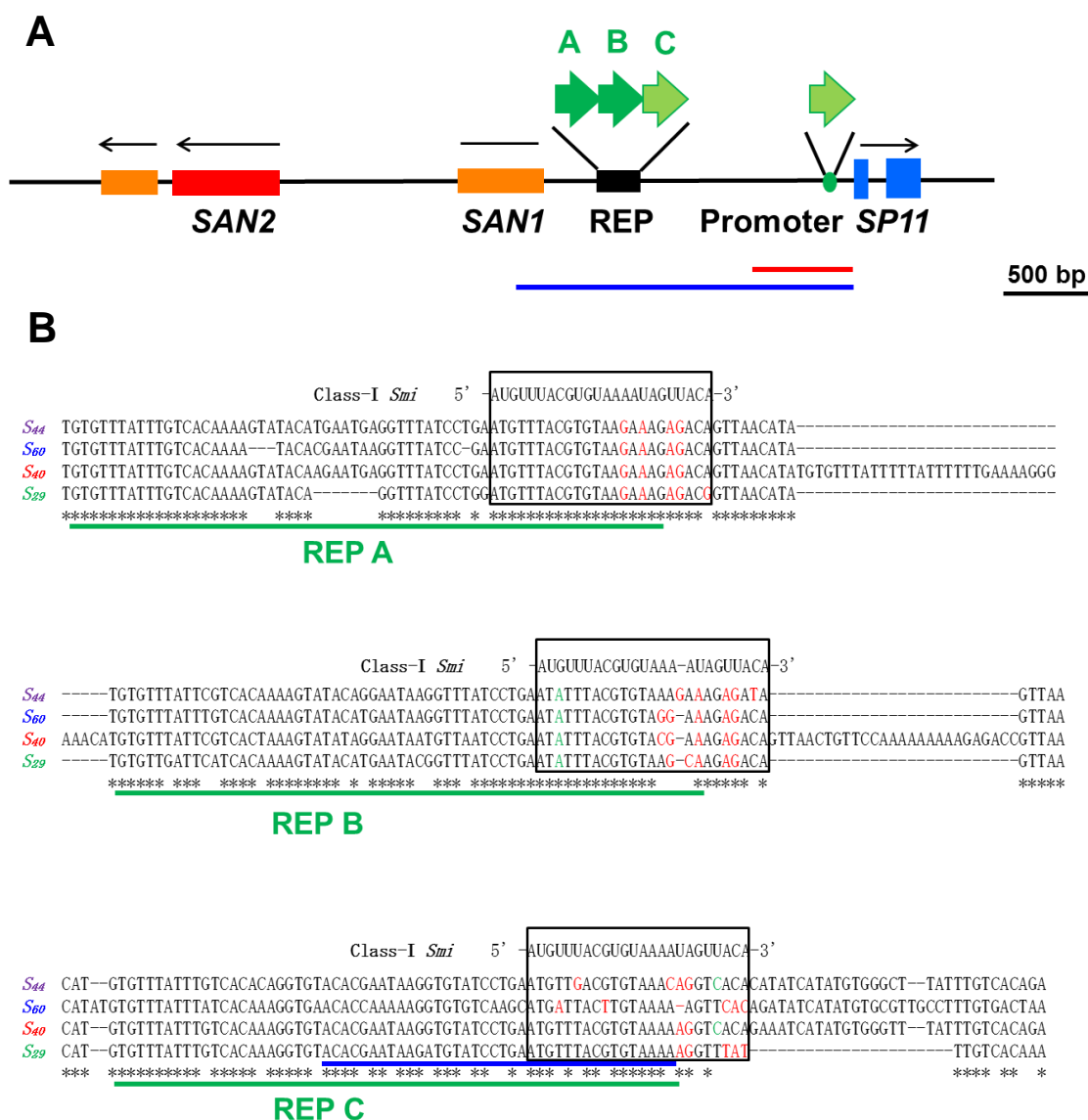
このような繰り返し配列がメチル化の標的となる例はいくつか報告されており、有名な例としてトウモロコシのパラミューテーションにおける *booster1 (b1)* 遺伝子座が挙げられる (Stam *et al.*, 2002)。*b1* 遺伝子座には高発現型の *B-I*アリルと、*B-I*アリルと同じ塩基配列でありながら発現が抑制されている *B*アリルが存在しており、この両者が相互作用すると *B*アリルによって *B-I*アリルは *B*アリルへと変化する。このパラミューテーションには *b1* 遺伝子の約 100 kb 上流にあ

る 850 bp 配列の 7 回繰り返し配列が重要であることが明らかとなっている。この繰り返し配列と DNA メチル化には相関が見られており、発現が抑制されている *B'* アリルでは DNA のメチル化程度が高く、高発現型の *B-I* アリルでは DNA のメチル化程度は低くなっている (Stam *et al.*, 2002; Haring *et al.*, 2010)。さらに、この繰り返し配列が 1 回の場合はパラミューテーションは起きず、少なくとも 3 回の繰り返し配列があればパラミューテーションが起きることが明らかとなっている (Stam *et al.*, 2002)。以上のように *b1* 遺伝子の DNA メチル化はリピート構造に依存して起きており、REP においても 3 つのリピートの内 1 つのリピートを欠失させることで REP のメチル化や *SP11* 発現抑制に変化が起きるかどうかは興味深い。

一般的にプロモーターの DNA メチル化は転写の抑制に寄与していると考えられるが、DNA のメチル化のみではかならず転写が抑制されるわけではない (Okano *et al.*, 2008)。岡野らはサイレンサーとして様々な標的遺伝子のプロモーター領域のヘアピンコンストラクトを導入し、標的遺伝子の転写抑制を調べた。サイレンサーにより転写が抑制されている標的遺伝子のプロモーターは DNA のメチル化のみならず、ヒストン H3 の脱アセチル化、H3K9 のジメチル化が観察されていたが、一方転写が抑制されなかった標的遺伝子はプロモーターの DNA メチル化は観察されたものの、ヒストン修飾に影響は見られなかった (Okano *et al.*, 2008)。以上のことは標的遺伝子の発現抑制にはヒストン修飾が重要であることを示唆しており、本 *Smi* 依存的な *SP11* の発現抑制に関してもヒストン修飾が関与しているか今後明らかにしていく必要がある。

本章により *Smi* による強力な発現抑制には *SP11* 遺伝子上流 0.58 kb のプロモーターのみでは不十分であることが明らかとなった。REP を含む *S<sub>60</sub>-SP11* の上流 1.95 kb のプロモーターに *GUS* 遺伝子を連結させたコンストラクトでは Class-I *S* ハプロタイプ共存下で強い発現抑制が見られたものの、1000 分の 1 よりも弱い発現抑制しか見られず、内在性の *SP11* の発現抑制に比べて弱い発現抑制しか確認されなかった。このことは *Smi* による劣性 *SP11* 対立遺伝子の強力な発現抑制には、*SP11* 遺伝子の翻訳開始点からその上流 1.95 bp のみで

は不十分であることを示唆しているのかもしれない。本研究では *SP11* コーディング領域を *GUS* 遺伝子に置き換え実験に使用しており、強力な発現抑制にコーディング領域や 3' 領域を含む広範囲のゲノム領域が関与している可能性も考えられる。今後、3C (Chromosome conformation capture) 等の手法を用いて、*SP11* 周辺領域のクロマチン相互作用を明らかにし、シス配列を同定することが、本 *Smi* 依存的な強力発現抑制メカニズムの解明に重要であると考えられる。



**Fig. 3-1. *S60*-*SP11* 周辺のゲノム構造と REP 領域**

(A) *SP11*、*SAN1*、*SAN2*をそれぞれ青、橙、赤で示した。矢印は転写の向きを表している。緑の円は *S60*-*SP11* プロモーター領域を表す。緑の矢印はリピートを示している。赤の下線は後の形質転換実験に用いた *SP11* 翻訳開始点上流 0.58 kb (*S60*-*SP11* short pro) の領域を示し、青の下線は *SP11* 翻訳開始点上流 1.95 kb (*S60*-*SP11* long pro) の領域を示している。(B) Class-II *S* ハプロタイプの REP のゲノム配列と Class-I *Smi* との相同性。*S44*-、*S40*-、*S29*-REP の配列は

Kakizaki *et al.*, 2006 より引用し、*S60-REP* に関しては独立に配列決定を行った。青の下線は *SP11* プロモーターと相同性の高い領域を示している。

sRNA	target	promoter	REP		
		<i>S<sub>44</sub>-SP11</i>	<i>S<sub>44</sub>-REP-A</i>	<i>S<sub>44</sub>-REP-B</i>	<i>S<sub>44</sub>-REP-C</i>
Class-I <i>Smi</i>		5.5	4.0	6.0	5.5

sRNA	target	promoter	REP		
		<i>S<sub>60</sub>-SP11</i>	<i>S<sub>60</sub>-REP-A</i>	<i>S<sub>60</sub>-REP-B</i>	<i>S<sub>60</sub>-REP-C</i>
Class-I <i>Smi</i>		4.5	4.0	6.0	8.0

sRNA	target	promoter	REP		
		<i>S<sub>40</sub>-SP11</i>	<i>S<sub>40</sub>-REP-A</i>	<i>S<sub>40</sub>-REP-B</i>	<i>S<sub>40</sub>-REP-C</i>
Class-I <i>Smi</i>		5.5	4.0	6.0	2.5

sRNA	target	promoter	REP		
		<i>S<sub>29</sub>-SP11</i>	<i>S<sub>29</sub>-REP-A</i>	<i>S<sub>29</sub>-REP-B</i>	<i>S<sub>29</sub>-REP-C</i>
Class-I <i>Smi</i>		5.5	5.0	6.0	5.0

Fig. 3-2. Class-I *Smi* と Class-II *SP11* プロモーターおよび REP との  
 相同性

Class-I *Smi* と *S<sub>44</sub>-REP* (A)、*S<sub>60</sub>-REP* (B)、*S<sub>40</sub>-REP* (C)、*S<sub>29</sub>-REP*  
 (D) との mispair score を示した。mispair score 5.5 以下の場合を赤  
 で示した。

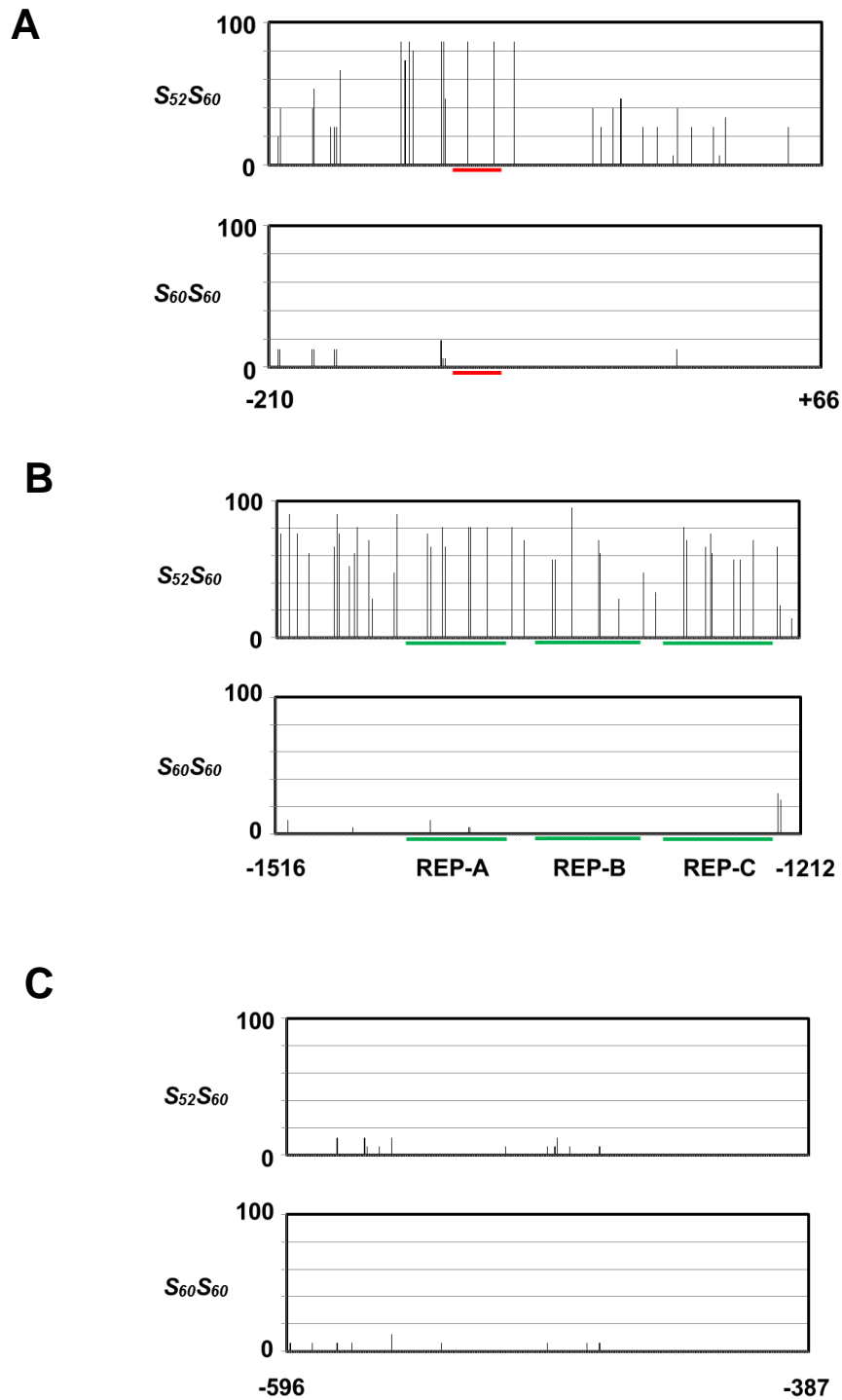


Fig. 3-3.  $S_{60}S_{60}$ 、 $S_{52}S_{60}$  個体における DNA メチル化解析

(A)  $SP11$  プロモーター領域の DNA メチル化解析。赤色の下線は  $Smi$  と相同性の高い領域を表す。(B) REP 領域の DNA メチル化解析。緑色の下線は左から REP-A, REP-B, REP-C を示している。(C)  $SP11$  プ



ロモーター領域と REP 領域間のメチル化解析。それぞれのダイアグラムの下の数値は、*S60-SP11* 翻訳開始点を+1 とした時の数値を示している。

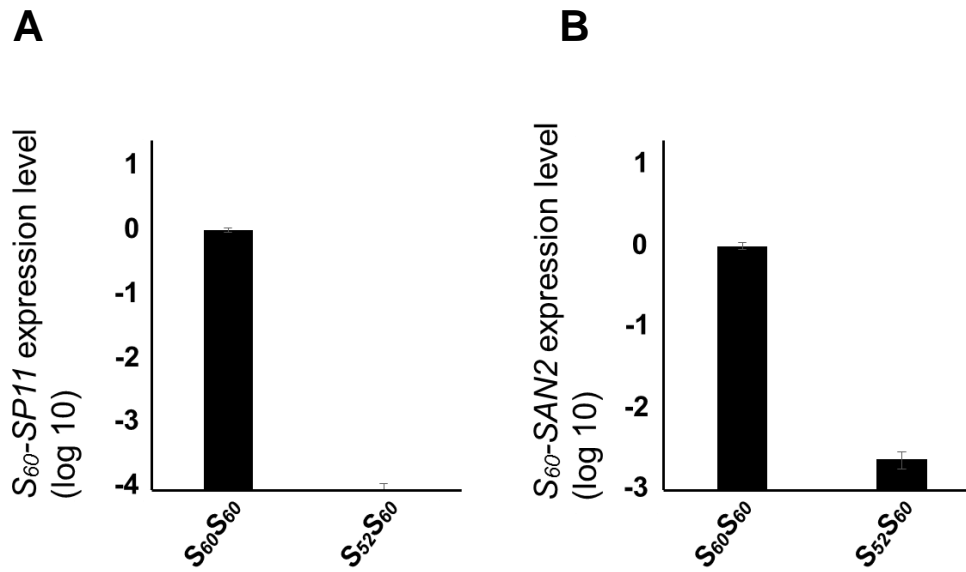


Fig. 3-4. 定量リアルタイム PCR による  $S_{60}$ - $SP11$ 、 $SAN2$  遺伝子の発現解析

(A, B)  $S_{60}S_{60}$ 、 $S_{52}S_{60}$  個体における  $S_{60}$ - $SP11$ 、 $SAN2$  の発現量解析を行った。ステージ 5 の葯から RNA を抽出し、内部標準には  $GAPDH$  を用いた。

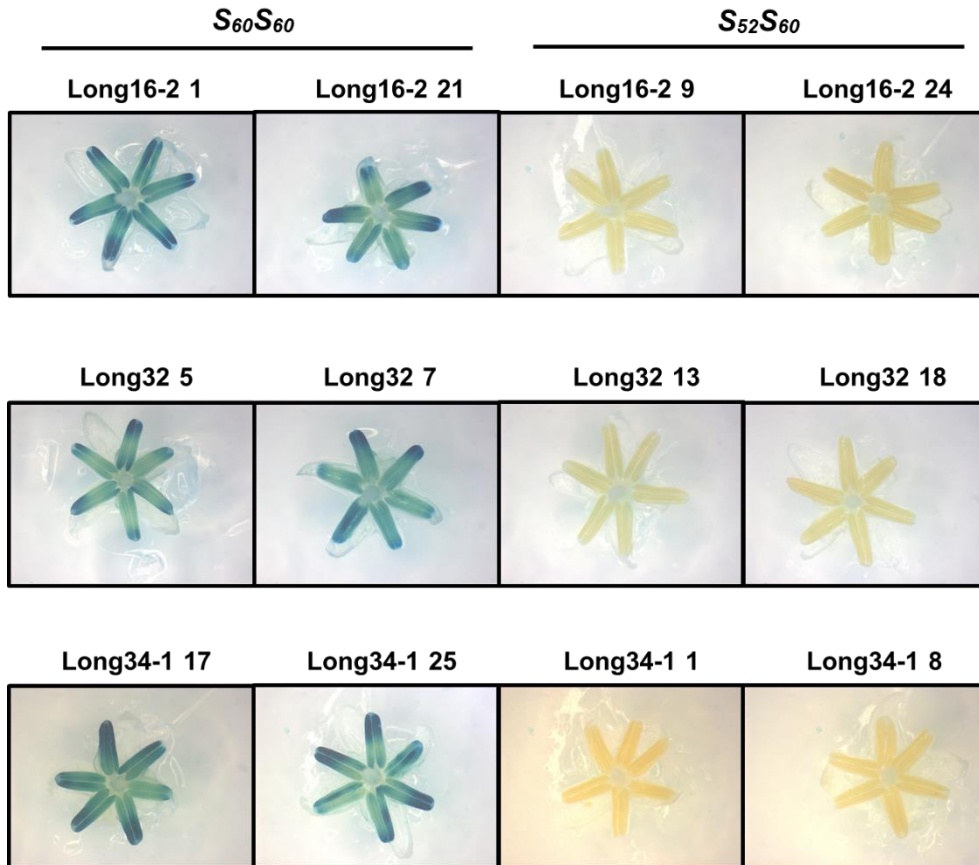


Fig. 3-5.  $S_{60}SP11$  long pro::*GUS* 導入株における GUS 染色の観察

形質転換によって得られた 3 ライン (Long16-2、Long32、Long34-1) の個体における Class-I  $S_{52}$  ハプロタイプ共存下、非共存下での GUS 染色の結果。

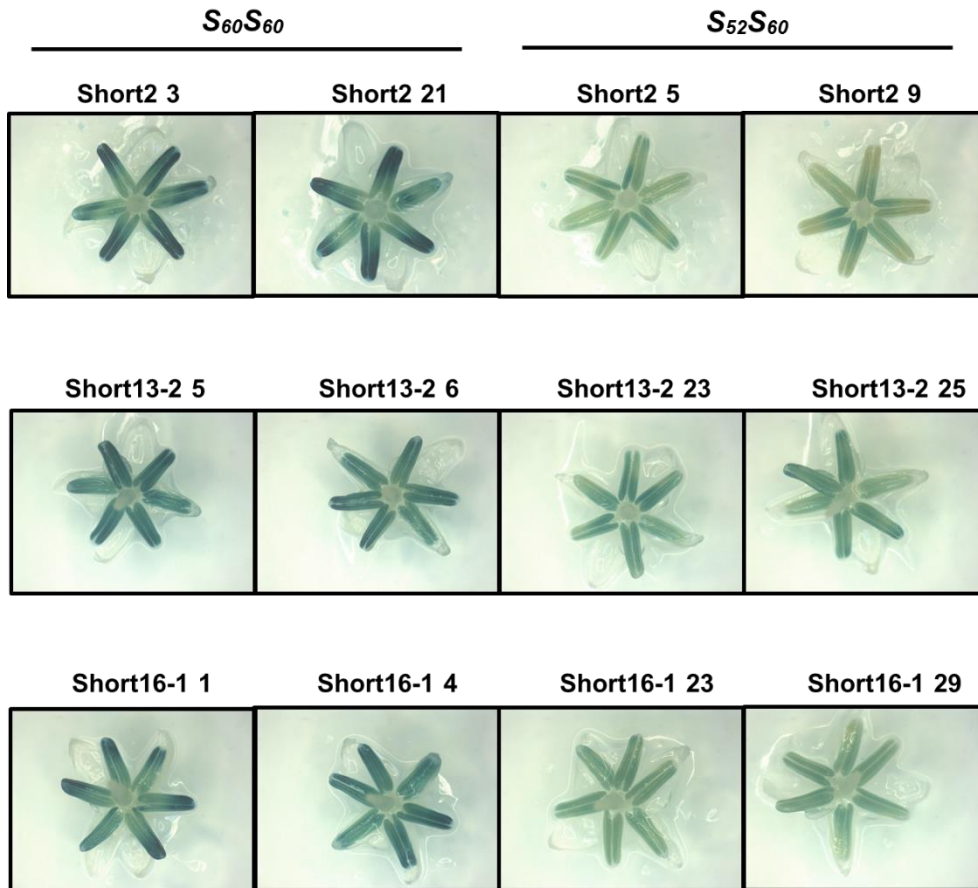
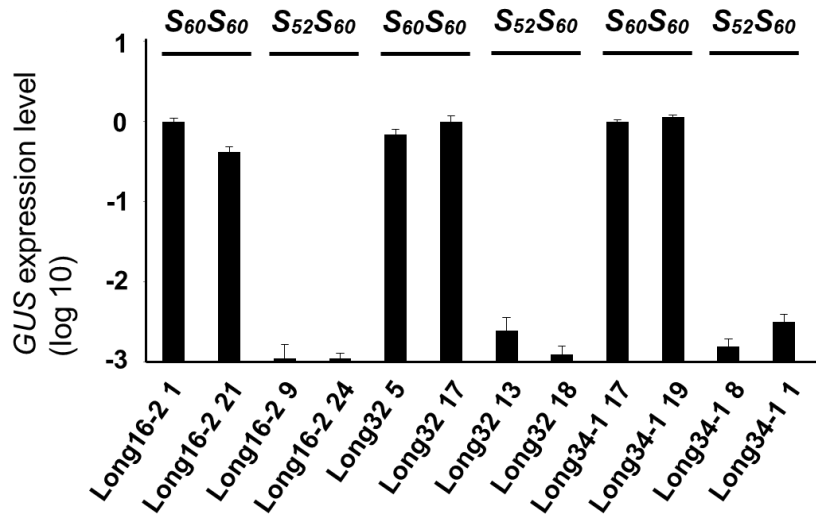
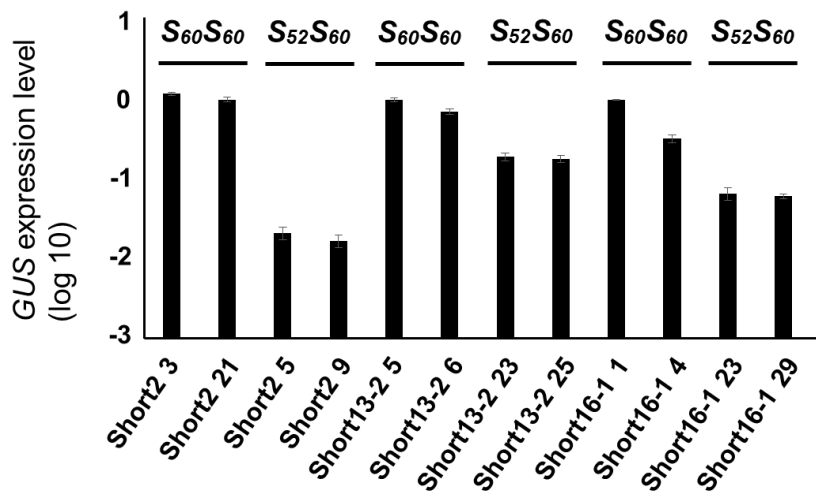


Fig. 3-6.  $S_{60}$ - $SP11$  short pro:: $GUS$  導入株における GUS 染色の観察

形質転換によって得られた 3 ライン (Short2、Short13-2、Short16-1) の個体における Class-I  $S_{52}$  ハプロタイプ共存下、非共存下での GUS 染色の結果。

**A****B**

**Fig. 3-7.  $S_{60}$ -SP11 プロモーター :  $GUS$  導入株における  $GUS$  遺伝子の発現解析**

定量 PCR によって  $S_{60}$ -SP11 long pro :  $GUS$  導入株 (A) と  $S_{60}$ -SP11 short pro :  $GUS$  導入株 (B) における  $GUS$  遺伝子の発現量を解析した。

## 総括

優劣性は遺伝学の祖と呼ばれるグレゴール・メンデルによって発見された古典的な現象であり、生物界に広く見られる一般的な遺伝現象である。優劣性現象の遺伝学的メカニズムやその進化に関しては、1920年代に集団遺伝学の祖と呼ばれた Sir Ronald A. Fisher と Sewall Wright の間で激しい論争が繰り広げられていたように (Billiard and Castric, 2011)、遺伝学において最も議論されたトピックの1つである。

これまで、優劣性の現象は劣性対立遺伝子が機能を失っていることが原因であると考えられてきたが、本研究室ではこの古典的な優劣性の現象に低分子 RNA を介したエピジェネティックな制御機構が関わることをアブラナ科植物 *B. rapa* の花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の優劣性現象から明らかにしてきた (Tarutani *et al.*, 2010)。本機構では優性側 (Class-I) の *S* ハプロタイプから生産される低分子 RNA (*Smi*) が高い相同性を示す劣性 (Class-II) *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーターのメチル化を誘導することで劣性 *SP11* の発現を強く抑制する (Tarutani *et al.*, 2010)。しかしながら、この低分子 RNA によるエピジェネティックな優劣性制御機構が、他の優劣性現象において普遍的に機能しているかどうかは不明であった。また、*B. rapa* において本制御機構では劣性 *SP11* 対立遺伝子の発現を数万分の1にまで強く抑制するが、詳細なメカニズムについては未解明であった。そこで、本研究では低分子 RNA によるエピジェネティックな優劣性制御機構の普遍性とその強力な発現抑制メカニズムの解明を目的として研究を行った。

1つ目の課題である低分子 RNA による優劣性制御機構の普遍性の検証については、第1章において *B. rapa* の Class-II 間に見られる直線的な優劣性が新たな低分子 RNA (*Smi2*) によって制御されていることを明らかにした。*Smi2* とその標的である *SP11* プロモーターが多型性を有しており、優性 *S* ハプロタイプから生産される *Smi2* が自己よりも劣性ハプロタイプの *SP11* プロモーターに対して mispair score 5.5 以下の高い相同性を示すことで *SP11* の発現を抑制し、4つの *S* ハプロタイプ間の優劣性を制御していることを示した。Class-I/Class-II

間の優劣性制御を明らかにした先行研究と合わせると (Tarutani *et al.*, 2010)、*B. rapa* における複雑な優劣性 [Class-I ( $S_8, S_9, S_{12}, S_{52}$ ) > Class-II ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ )] が *Smi* と *Smi2* の僅か 2 つの低分子 RNA で制御されていることを示すことができ、低分子 RNA とその標的が多型性を獲得することで複雑な優劣性が進化しうるという新たな優劣性進化モデルを提唱する事ができた。

さらに第 2 章では、同じアブラナ科自家不和合性植物である *A. lyrata* に見られる複雑な優劣性に着目し、本優劣性関係を制御しうる 2 種類の低分子 RNA の存在を見出した。本優劣性においても優性 *S* ハプロタイプから生産される低分子 RNA が自己よりも劣性の *SP11* に対して mispair score 5.5 以下の高い相同性を示しており、*B. rapa* と同様に低分子 RNA とその標的の配列多型性により複雑な優劣性関係が生まれてきていることが示唆された。

第 1 章および第 2 章で得られた低分子 RNA は、1920 年代に Fisher が優劣性を制御する因子として提唱したドミナンスモディファイヤーに相当している。花粉側因子 *SP11* 対立遺伝子間における優劣性は、花粉における片方の *S* ハプロタイプの表現型が現れなくなるため、交配相手を増やす効果が期待される。氷河期など繁殖に不適切な環境下ではこれらの優劣性は有利に働くと考えられ、このような場合には低分子 RNA がドミナンスモディファイヤーとして普遍的に進化しうる可能性を強く示唆した。

第 3 章において、第 2 の課題である *Smi* による強力な劣性 Class-II *SP11* 対立遺伝子発現抑制の機構解明については、その要因の 1 つに、Class-II *SP11* 遺伝子の約 1.2 kb 上流に存在している *SP11* プロモーターと相同性の高い 3 回繰り返し配列 (REP) が関与していることを明らかにした。

本論文により、アブラナ科植物の花粉側自家不和合性決定対立遺伝子間の複雑な優劣性制御に低分子 RNA を介したエピジェネティックな発現制御機構が普遍的に関与することが示された。さらに、その低分子 RNA による強力な遺伝子発現抑制には標的配列周辺の広範囲にわたるゲノム構造が関わる可能性が示された。本研究で得られた知見は、他の優劣性現象のみならず、動植物において広く見られる単一对立遺伝子発現や、低分子 RNA を用いた標的遺伝子の抑制を目的とし

た遺伝子工学の理解にも貢献することが期待される。



## 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学研究室、高山誠司教授のもと 2013 年 4 月から 2016 年 8 月までの約 3 年半をかけて行いました。

本研究を行うにあたり、非常に魅力的で興味深いテーマと素晴らしい研究環境を与えてください、常に的確な御助言を賜りました高山誠司教授に感謝申し上げます。当時、就職をしていた私の突然の入学希望にも快く引き受けて下さり、知識が乏しかった私を辛抱強く指導し、昼夜問わず議論して下さったことを心よりお礼申し上げます。

研究をはじめ、ラボセミナー等で様々な御指導、御助言を賜りました同大学和田七夕子助教、村瀬浩司助教、藤井壮太助教、岩野恵助教(現 大阪大学)に厚くお礼申し上げます。特に、エピジェネティクス研究および本博士論文執筆に対しご助言ご指導頂きました和田七夕子助教、申請書作成や投稿論文作成時にご指導を賜りました村瀬浩司助教、系統学および野外の生物集団における実験に対しご指導頂きました藤井壮太助教には改めて深く感謝申し上げます。

また、共同研究者の(独)野菜茶業研究所・柿崎智博博士、筑波大学・柴博史教授、神戸大学・安田(高崎)剛志教授、大阪教育大学・鈴木剛教授、東北大学・渡辺正夫教授、チューリッヒ大学・清水健太郎准教授に深くお礼申し上げます。

実験を行う上で、有益な御助言、実験手法等を御教示賜りました三浦栄子博士、樽谷芳明博士、久保健一博士、下里裕子博士、円谷徹之博士、後藤千恵子博士、五十嵐元子博士に心より感謝いたします。東北大学・高田美信博士には *A. lyrata* の  $S_{20}$  ハプロタイプを持つ個体の種子を分与していただいたこと、栽培について丁寧にご享受いただいたことを感謝致します。京都産業大学・河邊昭准教授には *A. lyrata* の  $S_{13}$  ハプロタイプを持つ個体の種子を分与していただいたこと、および野生植物の採集にお付合いご指導頂けたことを感謝致します。

研究を行う上で、技術補佐官の森恵理氏、吉村裕子氏、児玉房子氏、岡村桃子氏、奈良真弓氏には実験植物の栽培や管理、実験の補助等をしていただいたことを深く感謝いたします。また、書類の手続きや研究室生活における様々な場面でお世話になりました秘書の阿部愛氏、山中美和子氏には心から感謝申し上げます。また、細胞間情報学研究室の先輩、同期、後輩の皆様には、本研究を行うにあたり大変お世話になりました。この場を借りて、御礼申し上げます。

本論文の審査委員である同大学、梅田正明教授、中島敬二教授には、サマーキャンプ、ヒアリング等を含め、的確な御指導、御助言を賜りましたこと、深く感謝いたします。

本研究は、平成 26 年度と平成 27 年度の 2 年間、日本学術振興会の援助により行われました。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 137—159.
- Bhattacharyya, M. K., Smith, A. M., Ellis, T. H., Hedley, C. and Martin, C. (1990). The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell.* 60: 115—122.
- Billiard, S. and Castric, V. (2011). Evidence for Fisher's dominance theory: how many 'special cases'? *Trends Genet.* 27: 441—445.
- Bologna, N. G., Mateos, J. L., Bresso, E. G. and Palatnik, J. F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J.* 28: 3646—3656.
- Brennan, A. C., Tabah, D. A., Harris, S. A. and Hiscock, S. J. (2011). Sporophytic self-incompatibility in *Senecio squalidus* (Asteraceae): *S* allele dominance interactions and modifiers of cross-compatibility and selfing rates. *Heredity* 106: 113—123.
- Brodersen, P and Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22: 268—280.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. and Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33: e179.
- Durand, E., Méheust, R., Soucaze, M., Goubet, P. M., Gallina, S., Poux, C., Fobis-Loisy, I., Guillon, E., Gaude, T., Sarazin, A.,

Figeac, M., Prat, E., Marande, W., Bergès, H., Vekemans, X., Billiard, S. and Castric, V. (2014). Dominance hierarchy arising from the evolution of a complex small RNA regulatory network. *Science* 346: 1200—1205.

Fahlgren, N. and Carrington, J. C. (2010). miRNA Target Prediction in Plants. *Methods Mol. Biol.* 592: 51—57.

Fisher, R. A. (1928). The possible modification of the response of the wild type to recurrent mutations. *Am. Nat.* 62: 115—126.

Fukai, E., Fujimoto, R. and Nishio, T. (2003). Genomic organization of the *S* core region and the *S* flanking regions of a class-II *S* haplotype in *Brassica rapa*. *Mol. Genet. Genomics* 269: 361—369.

Gimelbrant, A. Hutchinson, J. N., Thompson, B. R. and Chess, A. (2007). *Science*. 318; 1136—1140.

Goubet, P. M., Bergès, H., Bellec, A., Prat, E., Helmstetter, N., Mangenot, S., Gallina, S., Holl, A. C., Fobis-Loisy, I., Vekemans, X. and Castric, V. (2012). Contrasted patterns of molecular evolution in dominant and recessive self-incompatibility haplotypes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 8: e1002495.

Guo, M., Rupe, M. A., Zinselmeier, C., Habben, J., Bowen, B. A. and Smith, O. S. (2004). Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell.* 16; 1707—1716.

Guo, Y. L., Zhao, X., Lanz, C. and Weigel, D. (2011). Evolution of the *S*-locus region in *Arabidopsis* relatives. *Plant Physiol.* 157: 937—946.

Haring, M., Bader, R., Louwers, M., Schwabe, A., van Driel, R. and

Stam, M. (2010). The role of DNA methylation, nucleosome occupancy and histone modifications in paramutation. *Plant J.* 63: 366—378.

Hatakeyama, K., Watanabe, M., Takasaki, T., Ojima, K. and Hinata, K. (1998). Dominance relationships between *S*-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* 80: 241—247.

Hatakeyama, K., Takasaki, T., Suzuki, G., Nishio, T., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (2001). The *S* receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in *Brassica*. *Plant J.* 26: 69—76.

Joron, M., Papa, R., Beltrán, M., Chamberlain, N., Mavárez, J., Baxter, S., Abanto, M., Bermingham, E., Humphray, S. J., Rogers, J., Beasley, H., Barlow, K., ffrench-Constant, R. H., Mallet, J., McMillan, W. O. and Jiggins, C. D. (2006). A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in *Heliconius* butterflies. *PLoS Biol.* 4: e303.

Kachroo, A., Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (2001). Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* 293: 1824—1826

Kakizaki, T., Takada, Y., Ito, A., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A. and Watanabe, M. (2003). Linear dominance relationship among four class-II *S* haplotypes in pollen is determined by the expression of *SP11* in *Brassica* self-incompatibility. *Plant Cell Physiol.* 44: 70—75.

Kakizaki, T., Takada, Y., Fujioka, T., Suzuki, G., Satta, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S. and Watanabe, M. (2006). Comparative analysis of the *S*-intergenic region in class-II *S* haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa* (syn. *campestris*).

*Genes Genet. Syst.* 81: 63—67.

Kimura, R., Sato, K., Fujimoto, R. and Nishio, T. (2002). Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant J.* 29: 215—223.

Kowyama, Y., Takahasi, H., Muraoka, K., Tani, T., Hara, K. and Shiotani, I. (1994). Number, frequency and dominance relationships of *S*-alleles in diploid *Ipomoea trifida*. *Heredity* 73: 275—283.

Kusaba, M., Tung, C. W., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (2002). Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiol.* 128: 17—20.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10: R25.

Llaurens, V., Billiard, S., Castric, V. and Vekemans, X. (2009). Evolution of dominance in sporophytic self-incompatibility systems: I. Genetic load and coevolution of levels of dominance in pollen and pistil. *Evolution* 63: 2427—2437.

Llaurens, V., Billiard, S., Leducq, J. B., Castric, V., Klein, E. K. and Vekemans, X. (2008). Does frequency-dependent selection with complex dominance interactions accurately predict allelic frequencies at the self-incompatibility locus in *Arabidopsis halleri*? *Evolution* 62: 2545—2557.

Lorenz, R., Bernhart, S. H., Hoener zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA

Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 6: 26.

Mateos, J. L., Bologna, N. G., Chorostecki U. and Palatnik J. F. (2010). Identification of microRNA processing determinants by random mutagenesis of *Arabidopsis* MIR172a precursor. *Curr. Biol.* 20: 49—54.

Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B and Matzke, A. J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 367—376.

Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden [Experiments on plant hybrids], reprinted in J. Kr'izenecky (ed.), *Fundamenta Genetica*, Oosterhout: Anthropological Publications; Brno: Moravian Museum; and Prague: Czech Academy of Sciences (1965), pp. 57–92. English translation reprinted in C. Stern and E. Sherwood (eds.), *The Origin of Genetics: A Mendel Source Book*, San Francisco: W. H. Freeman (1966), pp. 1–48. Translation by Druery (1901) available at MendelWeb, URL: [www.netSPACE.org/MendelWeb](http://www.netSPACE.org/MendelWeb) (accessed July 30, 2001).

Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (1993). Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6: 79—86.

Okano, Y., Miki, D. and Shimamoto, K. (2008). Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *Plant J.* 53: 65—77.

Prigoda, N. L., Nassuth, A. and Mable, B. K. (2005). Phenotypic and genotypic expression of self-incompatibility haplotypes in *Arabidopsis lyrata* suggests unique origin of alleles in different dominance classes. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1609—1620.

- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16: 276—277.
- Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697—1700.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimosato, H., Che, F. S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A. and Takayama, S. (2002). The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell* 14: 491—504.
- Shiba, H., Kenmochi, M., Sugihara, M., Iwano, M., Kawasaki, S., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Takayama, S. (2003). Genomic organization of the *S*-locus region of *Brassica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 622—626.
- Shiba, H., Kakizaki, T., Iwano, M., Tarutani, Y., Watanabe, M., Isogai, A. and Takayama, S. (2006). Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nat. Genet.* 38: 297—299.
- Shiba, H. and Takayama, S. (2012). Epigenetic regulation of monoallelic gene expression. *Dev Growth Differ.* 54: 120—128.
- Stam, M., Belele, C., Dorweiler, J. E. and Chandler, V. L. (2002). Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *b1* locus is associated with paramutation. *Genes Dev.* 16: 1906—1918.
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E. and



Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8816—8820.

Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M. and Hinata, K. (1999). Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*<sup>9</sup> haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391—400.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Ojima, K., Watanabe, M., Toriyama, K. and Hinata, K. (1997). Factors Influencing *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Brassica rapa* L. *Japanese Journal of Breeding* 47: 127—134.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (2000). The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* 403: 913—916.

Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F. S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K. and Isogai, A. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1920—1925.

Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F. S., Watanabe, M., Iwano, M. and Isogai, A. (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413: 534—538

Takayama, S. and Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467—489.

Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Takayama, S. (2010). *Trans*-acting

small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 466: 983—986.

Wang, J., Valo, Z., Smith, D. and Singer-Sam, J. (2007). Monoallelic expression of multiple genes in the CNS. *PLoS One*. 12: e1293.

Wright, S. (1939). The Distribution of Self-Sterility Alleles in Populations. *Genetics*. 24: 538—552.

Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. and Qi, Y. (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol. Cell* 38: 465—475.

Wu, L. Mao, L. and Qi, Y. (2012). Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiol.* 160: 990—999.

Wu, Y., Wei, B., Liu, H., Li, T. and Rayner, S. (2011). MiRPara: a SVM-based software tool for prediction of most probable microRNA coding regions in genome scale sequences. *BMC Bioinformatics* 12: 107.

Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M. J., Wang, X. J. and Zhang, X. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1106—1115.

Zhuang, Y. and Adams, K. L. (2007). Extensive allelic variation in gene expression in populus F1 hybrids. *Genetics*. 177: 1987—1996.

柿崎 智博 (2006). アブラナ科自家不和合性における花粉側優劣性の分子制御機構解明. 博士論文 (岩手大学)

日置 智也 (2013). 自家不和合性の優劣性制御因子候補の機能解析.  
修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

下田 大貴 (2014). 自家不和合性における優劣性制御因子候補の機能  
解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

**Table S1** 本研究で使したプライマー配列

primer	sequence	purpose
S46 S-flanking F	5'-CGGTACCAAGATCAAGCACATTCAG-3'	Genomic sequencing
S60 SP11 downstream R	5'-CTGAGGTAACCTCAAGCAGATGTGATCTG-3'	Genomic sequencing
S40 SP11 downstream R	5'-CACCAAATCTTCCAATTTGTGATCTGAG-3'	Genomic sequencing
S44 SP11 downstream GenomeWalk R	5'-GGGAGGATTAATTGCTACTGTTGCAAAG-3'	Genomic sequencing
S44 SP11 downstream GenomeWalk R nested	5'-GTATGCAATATACGGCGCAGTGGATC-3'	Genomic sequencing
S44 SP11 downstream R	5'-TGGGTTTCATGCATGACCTGAGAAAC-3'	Genomic sequencing
S44 full SRK 5' F	5'-TACACCTTCTCGTTCTTGTAGTC-3'	Genomic sequencing
S40 full SRK 5' F	5'-AAAGGGTACATAACATTTACCAC-3'	Genomic sequencing
S29 full SRK 5' F	5'-TTGTCTGGGGAGCGATGAAAAG-3'	Genomic sequencing
Class-II full SRK 3' R	5'-TGGTGATTTGGTTCACTGTCC-3'	Genomic sequencing
Class-II SRK 3' F	5'-GAACCAAATCACCATGTCGATCATTGACG-3'	Genomic sequencing
S44 SM12 R	5'-ACTACATGCGAGTCTATCAGTCACGAAG-3'	Genomic sequencing
S44 SM12 F	5'-TTCGTGACTGATAGACTCGCATGATGC-3'	Genomic sequencing
S44 SLG R	5'-TTATTACTAGATTAACCGGTGATGTGC-3'	Genomic sequencing
S40 SM12 F	5'-TCTTTGTGACCGATAGACTCAGATGATGC-3'	Genomic sequencing
S40 SLG R	5'-CCTTATTAGAGTTAACCGGTGATGTGC-3'	Genomic sequencing
S44 SLG F	5'-GCACATGCACCGGTTAACTCTAGTAAT-3'	Genomic sequencing
S40 SLG F	5'-GCACATGCACCGGTTAACTCTAATAAGG-3'	Genomic sequencing
S-flanking region R	5'-ATCTTTTGTGGAACCTGGGTTAC-3'	Genomic sequencing
S604029 Smi2-RT	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACAGGCAACCAAGATA-3'	Stem-loop RT-PCR
miR166-RT	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACAGGCAACGGGGAA-3'	Stem-loop RT-PCR
miR166 F	5'-CAGCATCGGACAGGCTTCA-3'	Stem-loop RT-PCR
S60 Smi2 F	5'-CGGCGGACACACCTTATTTGTGA-3'	Stem-loop RT-PCR
S40 Smi2 F	5'-CGCGGTACACACTTTATCTGTGA-3'	Stem-loop RT-PCR
S29 Smi2 F	5'-CGCGACACACGTTATCTGTGA-3'	Stem-loop RT-PCR
universal RT	5'-GTGACGGTCCGAGGT-3'	Stem-loop RT-PCR
S44 SP11-RT-F	5'-TTGACATATGTTCAAGCTCTAGATGTGG-3'	quantitative real-time PCR
S44 SP11-RT-R	5'-TCGTGGAGTTTAAGCATGATCCTCTG-3'	quantitative real-time PCR
S60 SP11-RT-F	5'-TGACATCTGTTCAAGCACTAGATGTGG-3'	quantitative real-time PCR
S60 SP11-RT-R	5'-TTACACTCTGTGCTCCTGGAATTAATGC-3'	quantitative real-time PCR
S40 SP11-RT-F	5'-TTGACATATGTTCAAGCACTAGATGTGG-3'	quantitative real-time PCR
S40 SP11-RT-R	5'-TAGACAGTCTTCGCTCACTGAATTAACG-3'	quantitative real-time PCR
S29 SP11-RT-F	5'-TGACATCTGTTCAAGCACTAGATGTG-3'	quantitative real-time PCR
S29 SP11-RT-R	5'-TGACAGTCTGCTCTGGTATTAAAG-3'	quantitative real-time PCR
GAPDH-F	5'-GACCTTACTGTCAAGCTCAGAG-3'	quantitative real-time PCR
GAPDH-R	5'-CGGTGTATCCAAAGGATCCCT-3'	quantitative real-time PCR
AIH1a qPCR F	5'-TGGTGACGCTGGTATGGTTA-3'	quantitative real-time PCR
AIH1a qPCR R	5'-GGTCTGCCTCATGTCCCTAA-3'	quantitative real-time PCR
Sa SCR for qRT F	5'-AGCCATGTTCAAGGAATGGAAGA-3'	quantitative real-time PCR
Sa SCR for qRT R2	5'-TTGTTGCCATCCTCCGTAAGGTC-3'	quantitative real-time PCR
SAH2 F1 qPCR F	5'-GAGCCACCAGGAGACACAAATAG-3'	quantitative real-time PCR
SAH2 R1 qPCR R	5'-GAGAGTCTTAAGAGCTCGGAAG-3'	quantitative real-time PCR
GUS qPCR F	5'-TGCTGTGCGCTTTAACCTCT-3'	quantitative real-time PCR
GUS qPCR R	5'-GCTCTTTAATCGCCTGTAAGTG-3'	quantitative real-time PCR
S40 SP11 F	5'-TTTATTAAATAAAATTTAAAGTATT-3'	bisulphite sequencing
S40 SP11 R	5'-AATCCTAAATCCTCAACAAAAAAA-3'	bisulphite sequencing
S40 SP11 F nested	5'-GTATTTTGAAGAAATAGAGAGAG-3'	bisulphite sequencing
S40 SP11 R nested	5'-CTATATATATATTTTCTTACATATC-3'	bisulphite sequencing
S29 SP11 F	5'-TGTGAAATATTTTAAATGTTATTTGT-3'	bisulphite sequencing
S29 SP11 R	5'-AAACAATCTAACTCCACATCTA-3'	bisulphite sequencing
S29 SP11 F nested	5'-ATGTTATTTTGTATTATGTAAGG-3'	bisulphite sequencing
S29 SP11 R nested	5'-CTCTAAATATATATATTTTCTTAC-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 F	5'-TGATTGGAAATATTGTTATTTAAAT-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 R	5'-AATACACCTTCCATAAATAACTC-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 F nested	5'-TTGTTTATTAGTGTGGATTGAAG-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 R nested	5'-TTTACCTAAACATATATCAAAATC-3'	bisulphite sequencing
S60 REP F	5'-GAAGATGTTGATAAAAAAGGTAG-3'	bisulphite sequencing
S60 REP R	5'-TTTAATTAATATATATATTTTACCACCTC-3'	bisulphite sequencing
S60 REP F nested	5'-GTAATATAGTGAATGTTAAGTG-3'	bisulphite sequencing
S60 REP R nested	5'-TAAATTAATCACAACACACACAC-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 upstream F	5'-TTGTTGATTGATAAAATATTTTG-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 upstream R	5'-ATTTAAATAAATACTACTCACCACAC-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 upstream F nested	5'-GTATTAAATGTTATTTGTTATTATG-3'	bisulphite sequencing
S60 SP11 upstream R nested	5'-TATTCAATTCATAAAAACTATTC-3'	bisulphite sequencing