

ナス科植物ペチュニアの自家不和合性分子機構の解明

塚原 麻伊

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21日提出

## 目次

序論	-3-
第1章 花粉因子 SLF の形成する E3 ユビキチンリガーゼ複合体の解明	
1-1 序	-13-
1-2 材料及び方法	-14-
1-3 結果	-26-
1-4 考察	-34-
図および表	-37-
第2章 雌ざい因子 S-RNase 無毒化機構の解明	
2-1 序	-60-
2-2 材料及び方法	-61-
2-3 結果	-64-
2-4 考察	-68-
図および表	-70-
総括	-79-
謝辞	-82-
参考文献	-84-

## 序論

植物は受粉を風や昆虫に頼っているため、動物のように交配相手を自ら選び積極的に他殖することは出来ないと見られがちである。しかし、近親交配や自殖が続くことは、集団内の遺伝的多様性を低下させ、急激な環境変化などに対応できなくなり、絶滅の危険が増す。そこで植物は、自殖を妨げ他殖を促進するための様々な性質を獲得してきた。そのような性質の中で、特に遺伝学的に自己／非自己の花粉を識別する仕組みを、自家不和合性と呼んでいる。

自家不和合性は被子植物のおよそ半数がもっていると見積もられており、被子植物において普遍的なシステムである。自殖を妨げる方法は様々であり、例えばアブラナ科植物では花粉の吸水過程が阻害される。一方で、ナス科植物では花粉管の伸長が選択的に阻害されることによって受精が回避される。このことから、自家不和合性のメカニズムは単一ではなく、科の間で異なることが判る。近年、自家不和合性の分子機構が明らかになるにつれ、このことが分子レベルで証明されてきている (Franklin-Tong, 2008)。

この他家・自家受粉時の反応の違いを引き起こす自他識別の遺伝学は、その分子機構に依らず共通しており、*S*と呼ばれる一つの遺伝子座に存在する複対立遺伝子群 (*S*ハプロタイプ) を想定する事で説明出来る。各 *S*ハプロタイプは、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) の両者をコードしており、自家受粉時には同一 *S*ハプロタイプに由来する両因子が相互作用することにより何らかの自家不和合性反応が誘起され、受精が拒否されると考えられてきた (de Nattancourt, 2001 ; Franklin-Tong, 2008)。

本論文では、ナス科植物のペチュニア (*Petunia*) の自家不和合性の分子メカニズムについて研究した。ペチュニアは南アメリカを原産とする観賞用園芸植物であり、一般に栽培されている *P. hybrida* は、*P. inflata* と *P. axillaris* など複数の *Petunia* 種を交雑して作られた種である (Stehman *et al.*, 2009)。ペチュニアには完全自殖性のトマトなどとは異なって強い自家不和合性を示す *S*ハプロタイプが存在し、かつ栽培や形質転換の方法が容易かつ確立されているため、研究材料として適している (円谷, 2001)。

ナス科植物の自家不和合性は、バラ科、オオバコ科と共通した機構をもち、半数体花粉の *S*ハプロタイプが花柱の *S*ハプロタイプのいずれかと一致した場

合にのみ不和合反応を生じる、配偶体型自家不和合性である。自己および非自己花粉が柱頭に受粉した後、いずれにおいても吸水、発芽し、花粉管が伸長するが、自己花粉の場合においてのみ雌ずい途中で伸長が停止し、受精には至らない (Takayama and Isogai, 2005; Iwano *et al.*, 2012)。

ナス科の雌ずい側因子は *S* ハプロタイプ固有の配列をもつタンパク質として *Nicotiana alata* より発見され (Anderson *et al.*, 1986)、RNA を分解するリボヌクレアーゼ活性が確認されたことから、*S*-RNase と呼ばれるようになった (McClure *et al.*, 1989)。*S*-RNase は *N* 末端にシグナル配列をもつ分泌型タンパク質であり、ハプロタイプ間におけるアミノ酸配列の相同性は 40~90% と極めて多様性に富んでいる。その二次構造は 5 つの保存領域と、ハプロタイプ間で特に配列特異性があり自他認識に作用すると予想される 2 カ所の超可変領域からなる (Tsai *et al.*, 1992; Ioerger *et al.*, 1994; Matton *et al.*, 1997)。また、翻訳後修飾として *N*-グリコシド型糖鎖結合部位およびジスルフィド結合の存在が知られている (Woodward *et al.*, 1992; Ishimizu *et al.*, 1999; Oxley and Bacic, 1996)。

*P. inflata* や *N. alata* を用いた *S*-RNase 遺伝子導入体もしくは発現抑制体の作出実験により、*S*-RNase が雌ずい側の *S* 遺伝子産物であることが証明された (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994)。また RNase の活性中心であるヒスチジンに変異を入れた *S*-RNase の遺伝子導入実験により、RNase 活性が自家不和合性に必須であることも示された (Huang *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994)。また、糖鎖修飾部位のアスパラギンに変異を入れることにより、糖鎖修飾部分ではなくアミノ酸配列の違いに起因することが示唆されている (Karunanandaa *et al.*, 1994)。

*S*-RNase は花柱の通導組織と呼ばれる花粉管が通過する組織の細胞外マトリクスに多量に分泌されている (Cornish *et al.*, 1987)。また、花柱を伸長中の花粉管において、不和合の花粉管のみ RNA の分解が観察されたことから、*S*-RNase は伸長中の花粉管に侵入して、不和合特異的に細胞質内 RNA 分子を分解することによって細胞毒性を発揮し、花粉管伸長を阻害していると考えられている (McClure *et al.*, 1990)。この不和合特異的な RNA の分解を説明するために、*S*-RNase 遺伝子の近傍にコードされていることが期待される花粉因子の探索が、同じ *S*-RNase を雌ずい側因子として利用していると予測された様々な植物を使って行われた。まず、オオバコ科植物キンギョソウ *Antirrhinum hispanicum* の研究から花粉特異的に発現する *S* 遺伝子座の F-box タンパク質遺伝子 *SLF* (*S*-locus *F*-box) が *S*-RNase 遺伝子の近傍にコードされていることが示された (Lai *et al.*,

2002)。続いて、当研究室により、バラ科のウメ *Prunus mume* において、同様の F-box タンパク質 SLF が *S* 遺伝子座領域にコードされていることが確認されると共に、それらが *S* ハプロタイプ特異的な多型性を示すことが明らかにされた (Entani *et al.*, 2003)。ほぼ時を同じく、同様な F-box タンパク質がバラ科アーモンド *Prunus dulcis* と 2 種のチェリー *Prunus avium*、*Prunus cerasus* でも *S* 遺伝子座に見出され、独自に *SFB* (*S*-locus *F*-box) と命名された (Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003)。*S*-RNase 遺伝子の近傍に見出された *SLF/SFB* 遺伝子は、いずれもハプロタイプ間で多型が観察され、有力な花粉因子候補と考えられる様になった。

F-box タンパク質は、ユビキチン/26S プロテアソームタンパク質分解系において、分解標的タンパク質を特異的にユビキチン化修飾する SCF (Skp1-CUL1-F-box) 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識サブユニットであることから、SLF が非自己 S-RNase を認識してユビキチン-プロテアソーム分解系を通して無毒化するモデルが提唱された (Takayama and Isogai, 2005)。実際、*P. inflata* において *S*<sub>2</sub> ハプロタイプから見出された SLF が、*S*<sub>1</sub>-RNase と *S*<sub>3</sub>-RNase を無毒化していることを示唆する形質転換実験が報告され、このモデルの正当性が示唆された (Sijacic *et al.*, 2004)。しかし、一方で、*SLF* は *S*-RNase と共進化の関係がなくアミノ酸配列が極めて保存されていること、*S*-RNase のように超可変領域が存在しないことなど、多くの矛盾点が指摘されてきた (Newbigin *et al.*, 2008)。当研究室においては、*S*-RNase が全く異なる *S* ハプロタイプが 100%一致の *SLF* を持つ例を見出し、*SLF* と *S*-RNase の 1:1 の関係では自家不和合性現象を説明できないことを明らかにした。その後、当研究室で行われたペチュニア雄性生殖器官トランスクリプトームからの *SLF* の網羅的探索では、*S* 遺伝子座には複数の *SLF* 遺伝子がコードされていることが明らかになり、形質転換実験により、それぞれの SLF が異なる S-RNase を認識していることが示された。これらの結果から、1つの SLF ではなく複数の SLF が分担して非自己 S-RNase を認識する「協調的非自己認識モデル」が提唱された (Kubo *et al.*, 2010) (Fig. 1)。現在までにペチュニアでは 18 タイプの *SLFs* (*SLF1*~*18*) の存在が示唆されており、うちタイプ 1、2、3、9、14 については、担当する標的 S-RNase についても明らかになってきている (Kubo *et al.*, 2015; 久保ら、未発表)。なお本論文では、例えば *S*<sub>7</sub> ハプロタイプのタイプ 2 *SLF* は、*S*<sub>7</sub>-*SLF2* と表記する。

花粉因子である SLF は F-box タンパク質であることから、ユビキチン E3 リガーゼである SCF (Skp1-Cullin1-F-box) 複合体 (Hua and Vierstra, 2011) を形成すると考えられる。Xue らのグループはキンギョソウの SLF を用いた酵母 two-hybrid スクリーニングにより、*Skp1* ホモログである *AhSSK1* (*SLF-interacting Skp1-like1*) を発見した (Huang *et al.*, 2006)。また、ペチュニアの *SSK1* ホモログ (*PhSSK1*) クローニングし、*SSK1* が花粉特異的に発現していること、RNAi 発現抑制株では自家不和合性が打破されることを示した (Zhao *et al.*, 2010)。さらに、*in vitro* 転写翻訳系で作製した *PhSSK1* と *PhCUL1* (*P. hybrida* *Cullin 1*、本論文での *PhCUL1-G* に相当) の発現タンパク質が相互作用することを示し、SLF は典型的な SCF 複合体として機能すると主張した (Fig. 2A)。一方、Kao らのグループは *P. inflata* の SLF が同じく *P. inflata* 由来の 3 つの *Skp1* ホモログと結合しないことを示し、代わりに *SBP1* (*S-RNase Binding Protein 1*) と呼ばれる RING タンパク質がハブとして機能すると主張した。*SBP1* は元々 *S-RNase* と結合するタンパク質として発見されたものであるが、Kao らは *SBP1* が SLF だけでなく *PiCUL1-G* (*P. inflata* *CUL1-G*) および E2 ユビキチン結合酵素とも相互作用すること、*PiCUL1-G* が *Rbx1* と結合しないことを示し、SLF は非典型的な SCF 複合体を形成しているとした (Hua and Kao, 2006) (Fig. 2B)。しかしその後、同じナス科の野生トマトにおける一側性種間不和合性に関わる遺伝子として、*CUL1-G* とは進化的に異なるグループに属する *SpCUL1* (*Solanum pennellii* *CUL1*; 本論文での *CUL1-P* に相当) が同定された (Li *et al.*, 2010)。このナス科の一側性種間不和合性においても雌しべ側因子として *S-RNase* が関わっていることが知られていることから (Murfett *et al.*, 1996)、自家不和合性においても、*CUL1-G* ではなく *CUL1-P* が *S-RNase* の無毒化に関与している可能性も予想された。このように、SLF が形成すると考えられる複合体の構成分子については複数の説が提唱されており、コンセンサスが得られていない状況であった。

さて、上記の SLF 複合体が、雌しべ側因子 *S-RNase* をどの様にして無毒化しているのかについても全く判っていなかった。これまでに全く異なる 2 つの説、分解説 (Fig. 3A) と隔離説 (Fig. 3B) が提唱されている。SLF-GFP 融合タンパク質を発現させた花粉管の観察から、SLF は花粉管の細胞質全体に分布しており、花粉管に侵入した *S-RNase* は細胞質で SLF 複合体により認識されると予想されている (菊池, 2012; Sun and Kao, 2013)。SCF 複合体の一般的な機能から予測される *S-RNase* のユビキチン-プロテアソーム系による分解モデルについてこれまでに検証が行われている。Qiao らは、花柱抽出物に花粉タンパク質を

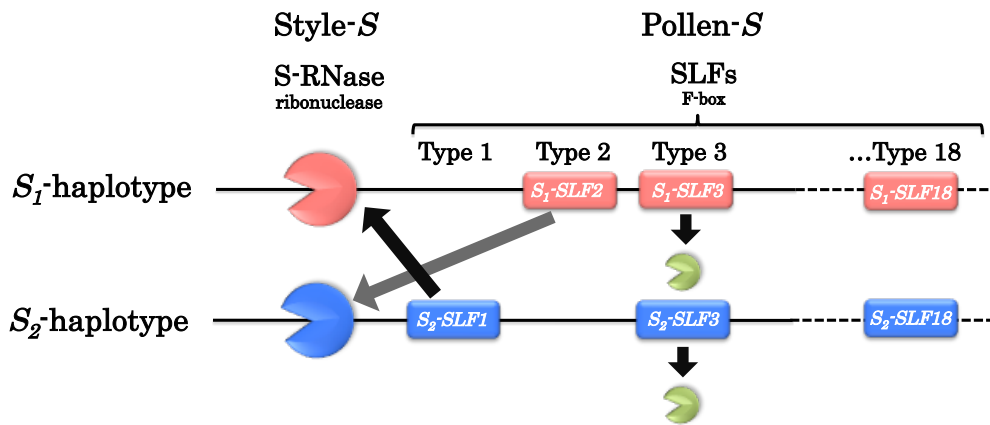
加えた後、S-RNase 抗体で免疫沈降したときに、花柱と花粉が自己の組み合わせである場合に、60 kDa と 90 kDa の大きさにユビキチン抗体および S-RNase 抗体で反応するバンドがあることを報告し、花粉 SCF<sup>SLFs</sup> による S-RNase ユビキチン化を再現したと主張した (Qiao *et al.*, 2004)。しかしながらこの実験では、ユビキチン化していない S-RNase がまったく見えていないこと、鎖長の異なるポリユビキチン鎖の付加によるスメアバンドもないことから、結果の解釈の妥当性に疑問を生じている。Hua と Kao は、花粉抽出物を加えるとユビキチン化されることを観察し、また、プロテアソーム阻害剤により、S-RNase の分解が阻害されることを示したが (Hua and Kao, 2006)、これらの活性にハプロタイプ特異性はなく、この結果が SLF 複合体ではなく花粉抽出物に含まれるその他のタンパク質によるものである可能性を否定できなかった。当研究室では花粉から免疫沈降法により精製した SLF 複合体が *in vitro* ユビキチン化実験において、ハプロタイプ特異的に S-RNase をユビキチン化すること、ユビキチン化 S-RNase が 26S プロテアソーム阻害剤処理で分解抑制されることを確認している (Entani *et al.*, 2014)。

一方、McClure らのグループは *N. alata* の蛍光免疫染色法による花柱内花粉管の観察から、和合性花粉では S-RNase が液胞様の区画に蓄積していることを観察し、S-RNase を何らかの区画に隔離することによって無毒化する隔離モデルを主張した (Goldraiji *et al.*, 2006)。このモデルにおいて、S-RNase はエンドサイトーシスにより花粉管内に取り込まれた後、液胞様区画へと輸送されて隔離されるが、不和合花粉では膜システムの崩壊により、液胞から細胞質へ S-RNase が漏出する。この膜システムの崩壊には HT-B と呼ばれる花柱タンパク質が関わっており、和合受粉時の花柱では HT-B が減少していること、HT-B のアンチセンス形質転換体では不和合受粉時でも S-RNase の隔離が起こり、自家不和合性が打破されることから、S-RNase と同時に花粉管内に取り込まれた HT-B が和合受粉時には分解されるが、不和合受粉時には分解されず、何らかの作用をして膜システムの崩壊を誘導しているとした (McClure *et al.*, 1999; Goldraiji *et al.*, 2006)。自他識別は分解説と同様に SLF と S-RNase の相互作用により行われるが、S-RNase のユビキチン化と分解ではなく、HT-B の安定化に作用していると主張している (Goldraiji *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011)。実験的証拠のない仮説が多く含まれる理解し難いモデルであるが、和合性花粉で特異的に S-RNase が特定の区画に隔離されているという観察結果が正しければ、上記分解説とは全く異なる機構を想定する必要が生じてくる。

本研究ではナス科植物における自家不和合性分子機構の解明を目的として、まず、第1章ではコンセンサスの得られていない SLF 複合体の構成と機能を明らかにするために、ペチュニアの CUL1 を主体にした機能解析を行った。また、第2章では、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体によりユビキチン化された非自己 S-RNase の無毒化機構を解明するために、花柱を伸長中の花粉管における S-RNase の分布を免疫電子顕微鏡法で調べて、分解モデルと隔離モデルの是非について検証した。



A



B

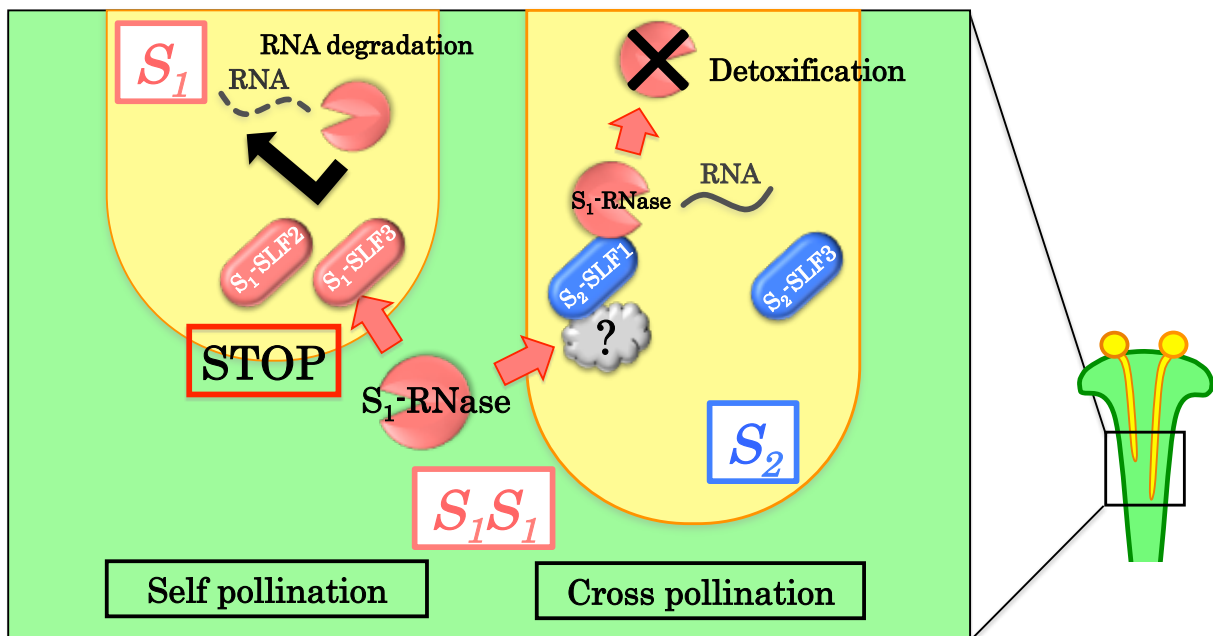


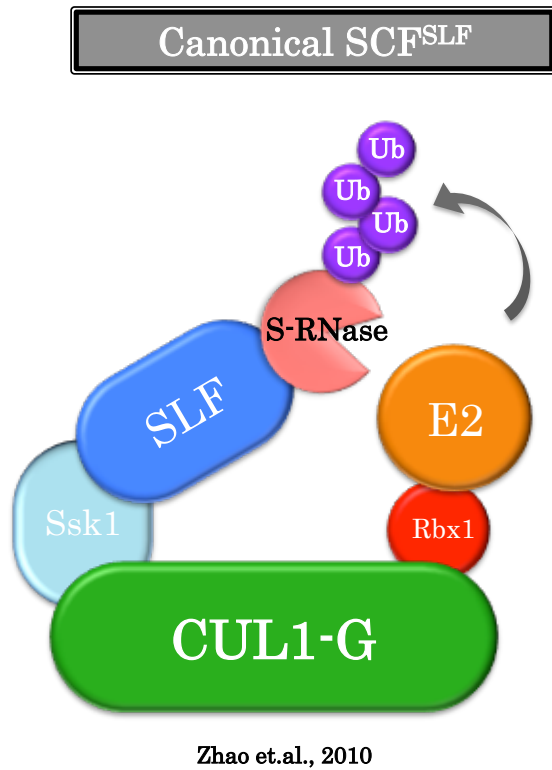
Fig. 1 S-RNase 型自家不和合性の協調的非自己認識モデル図

A.  $S$  遺伝子座には、単一の雌ずい因子 S-RNase と、複数の花粉因子 SLFs がコードされている。認識標的を矢印で示す。

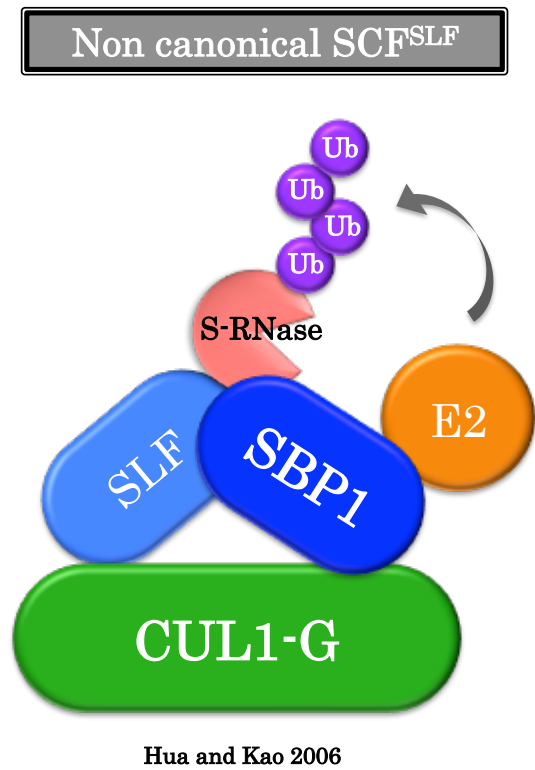
B. 協調的非自己認識分子機構モデル図。

SLF はタイプ毎に異なる認識標的を持ち、それらが協調的に多種類存在する非自己 S-RNase を認識し、無毒化すると考えられている。一方で、いずれの  $S$  ハプロタイプも自己 S-RNase を認識、解毒する SLF を持っていないので、自家不和合性を生じる (Kubo *et al.*, 2010, 2015)。

A



B



**Fig. 2** 提唱されていた 2 通りの SCF<sup>SLFs</sup> 複合体

A. 典型的 SCF 複合体の模式図 (Zhao *et al.*, 2010)。構成分子として SSK1 (Skp1)、CUL1-G、SLF、Rbx 1、E2 が含まれる。

B. 非典型的 SCF 複合体の模式図 (Hua and Kao 2006)。構成分子として、SBP1 もしくは CUL1-G、SLF、E2 が含まれ、SBP1 は Skp1 と Rbx2 の両方の機能を持つと提唱されている。

A

B

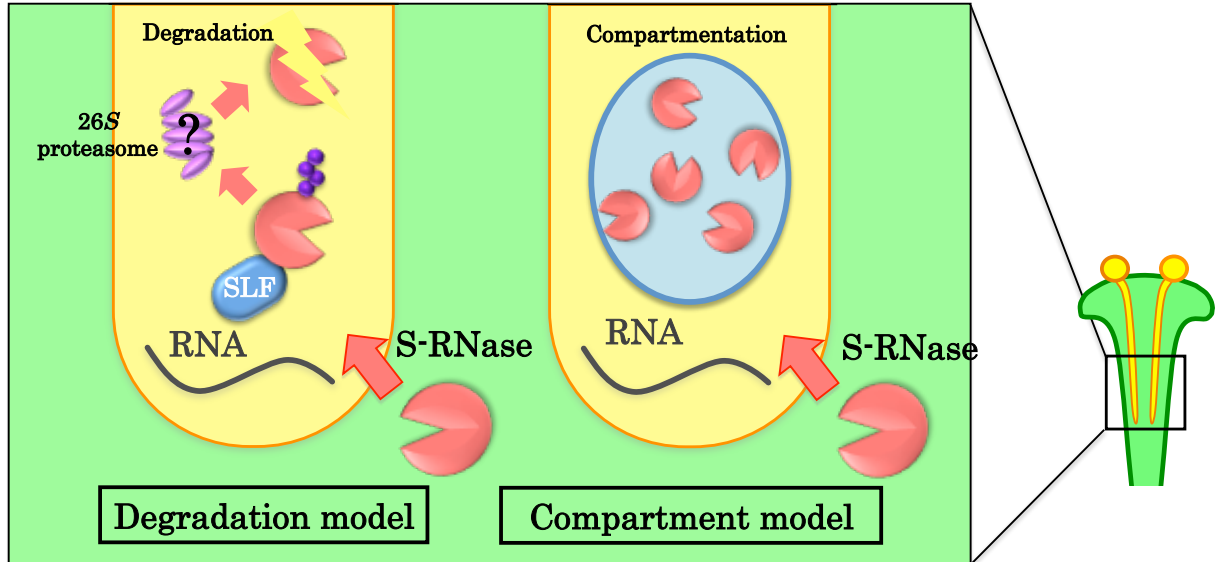


Fig. 3 提唱されていた 2 通りの S-RNase 無毒化機構

A. 分解モデル。花粉管内に侵入した非自己 S-RNase は、細胞質内で SLF によって認識された場合にユビキチン化を受け、26S プロテアソームによって分解されることで無毒化される。同モデルにおいて、自己 S-RNase に関しては、SLF による認識を免れるため、細胞毒性を発揮する。

B. 隔離モデル。花粉管内に侵入した S-RNase は、液胞へ隔離されることで、無毒化される。同モデルにおいて、自己 S-RNase に関しては、後に液胞の破壊が起こり細胞質内に放出されるため、毒性を発揮するとしている。

## 第 1 章 花粉因子 SLF の形成する E3 ユビキチンリガーゼ複合体の解明

## 1-1 序

序論で述べたように、SLFを含む複合体の構成分子については複数の候補が挙げられており、その本質は判っていなかった。当研究室における先行研究では、FLAG タグを付加した SLF (FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2) を発現させた花粉抽出物の抗 FLAG 抗体を用いた共免疫沈降実験において、SLF と共沈したタンパク質の質量分析により、典型的な SCF 複合体の構成成分である Skp1、CUL1、Rbx1 にそれぞれ相当するペプチドフラグメントが検出されていた (Fig. 1-1) (Entani *et al.*, 2014)。Skp1 については、すでに報告されている SSK1 のオルソログに相当した。SSK1 のノックダウン植物では和合性花粉管の伸長が阻害されることが報告されていることから、この結果の妥当性が支持された (Huang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010)。一方、CUL1 様ペプチドフラグメントは、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体に含まれるとされる CUL1-G (Hua *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010) ではなく、野生型トマトの種間不和合性で機能するとされる SpCUL1 (Li *et al.*, 2010) と相同性が高い、新規 CUL1 様分子 (CUL1-P) であることが示唆された。しかしながら、これまでペチュニアの花粉において発現している全 CUL1 について網羅した配列情報が得られていなかったため、CUL1-P が SCF<sup>SLFs</sup> 構成成分として唯一の CUL1 であるのか明らかではなかった。

そこで本章では、SLF と複合体を形成して機能する CUL1 の実体を明らかにすることを目的として、*P. hybrida* の雄性生殖器官トランスクリプトームから網羅的な探索を行い、花粉および葯で発現する CUL1 分子種の同定を行い、それらの機能解析を試みた。

## 1-2 材料・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。

本研究で用いた自家不和合性  $S_5$ -、 $S_7$ -、 $S_9$ -、 $S_{11}$ -ハプロタイプは *P. hybrida* に由来し (Entani *et al.*, 1999)、 $S_{17}$ -、 $S_{19}$ -ハプロタイプは *P. axillaris* に由来する (Tsukamoto *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2003)。ホモ接合体の Mitchell は、 $S_m$ -ハプロタイプであり、*P. axillaris* と *P. hybrida* から派生した純系品種である (Gerats and Vandebussche, 2005; Kubo *et al.*, 2015)。同じくホモ接合体の  $S_{0m}$ -は、Mitchell 自殖系統の商用自家和合性 Strawbesy Daddy の W132 に由来する機能欠損型  $S_0$ -RNase と相同な S-RNase、 $S_{0m}$ -RNase をもつ (Kubo *et al.*, 2015)。*P. axillaris* は *P. hybrida* の祖先種の一つであり、これらの種間交配は双方向に稔性であり、かつ種間雑種後代は正常な他家受粉稔性および自家不和合性を示すことから、本研究ではこれらの種を区別せず“ペチュニア”として扱った (Stehmann *et al.*, 2009)。それぞれの  $S$ ハプロタイプについてホモ接合の個体と、 $S_5S_5 \times S_{17}S_{17}$  に由来する  $S_5S_{17}$  個体を本研究に用いた。各系統は挿し木によって維持し、通常の温室栽培条件で栽培した。

### *P. hybrida* 花粉および葯で発現する *CUL1* 遺伝子の探索と同定

当研究室で構築した  $S_5$ -、 $S_9$ -、 $S_{11}$ -、 $S_{17}$ -、 $S_{19}$ -ハプロタイプのホモ個体の開裂前成熟葯、および  $S_7$ -ハプロタイプのホモ個体の花粉由来 EST データベース (Kubo *et al.*, 2015) に対して、GENETYX-MAC (ver. 16.0.6) を用い、*CUL1-P* の配列をクエリーとして Local BLAST 検索を行い、ヒットした配列をアセンブリした。得られた配列をもとに RT-PCR を行い、全長 cDNA 配列を確認した。

### ナス科における *CUL1* 遺伝子群の系統学解析

ペチュニア雄性生殖器官 EST より見いだされた 5 つの *CUL1* および他の植物種由来 *CUL1* の進化上の類縁関係を推定するため、分子系統樹を作製した。

系統樹作製には、本研究で同定した *Petunia hybrida* 由来 *PhCUL1-P*、*-B*、*-C*、*-E*、*-G* に加え、既知の *P. inflata* 由来 *PiCUL1-C*、*-G* (Hua and Kao, 2006)、*Solanum*

*pennellii* 由来 *SpCUL1* (Li and Cheterat, 2010)、さらに NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Protein データベースに Cullin1 タンパク質として登録されているものの中から、*S. habrochaites* 由来 *ShCUL1*、*S. lycopersicon* 由来 *SlCUL1*、*Solly\_S-1423\_02.30*、*Solly\_S04517\_01.10*、*S. tuberosum* 由来 *NW\_006239579*、*Nicotiana tomentosiformis* 由来 *ASAG01028099*、*N. sylvestris* 由来 *NW\_009525149*、*NW\_009527410*、*N. tabacum* 由来 *NiCUL1-A*、*-B*、*-C*、*-D*、*Arabidopsis thaliana* 由来 *AtCUL1*、*AtCUL2* を選び、これらの推定アミノ酸配列を使用した。アウトグループとして、ヒト *CUL1* を用いた。これら配列アライメントを Clustal-Omega ver. 1.2.1 (Sievers *et al.*, 2011) を用いて行い、MrBayes ver. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2011) でベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC) 法を用いて 1,000,000 反復により系統解析を行った。得られた結果は、Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) で可視化した。

### **CUL1-P および-G の機能欠失型 N 末端発現体 (*CUL1-P<sup>DN</sup>*, *-G<sup>DN</sup>*) 用コンストラクトの作製**

CUL1-P および-G の N 末端領域のみからなる機能欠失型タンパク質を、トマト由来の蒴および花粉特異的 *LAT52* 遺伝子プロモーター (Twell *et al.*, 1990) 制御下で発現する植物形質転換用プラスミドを作製した。

*CUL1-P* および *CUL1-G* の N 末端側 422 アミノ酸に対応する塩基配列の 5' 末端に *Bam*HI サイト、3' 末端に *Sac*I サイトを付加したプライマーセット (Table S1) を用い、プラスミド 35S-pro::ADH1-FLAG-CUL1-S-HSPT/pRI1201 (円谷、未発表)、または全長 *CUL1-G* cDNA クローンを鋳型として、PCR 反応を行った。PCR のサイクル条件は、[95°C, 5 min, (94°C, 30 sec, 55°C, 30 sec, 68°C, 90 sec) × 35 cycles, 68°C, 5 min] とした。

得られた PCR 反応産物を精製、濃縮した。PCR 産物と、植物形質転換用ベクタープラスミド LAT52-pro::FLAG:S<sub>7</sub>-SLF2-LAT52-pro::Venus/pBI121 (Kubo *et al.*, 2010) をそれぞれ *Bam*HI/*Sac*I で切断し、プラスミド中の *FLAG:S<sub>7</sub>-SLF2* 部位を上述の *CUL1-P* または *CUL1-G* 部分配列で置換して、LAT52-pro::*CUL1-P<sup>DN</sup>*-LAT52-pro::Venus/pBI121、および LAT52-pro::*CUL1-G<sup>DN</sup>*-LAT52-pro::Venus/pBI121 を得た。

### **CUL1-P および-G を標的とした、amiRNA による RNAi 発現抑制体 (*amiCUL1-P,-G*) コンストラクトの作製**

amiRNA をトマト由来の *LAT52* 遺伝子プロモーター (Twell *et al.*, 1990) 制御下、花粉・花粉管特異的に発現させる、RNAi 植物形質転換用プラスミドを作製した。

*A.thaliana miR319a* に、オーバーラッピング PCR 法を用いて部位特異的変異を挿入することにより、標的遺伝子に相同な人工 miRNA を生じる pre-miRNA 配列を作製した (Schwab *et al.*, 2006)。*miR319a* の 5'末端に *BamHI*、3'末端に *SacI* を付加するために、プライマー *miR319a-F* および *miR319a-R* (Table S1) を用い、*A.thaliana* のゲノムを鋳型として PCR 増幅を行った。サイクル条件は、[95°C, 5 min, (94°C, 30 sec, 55°C, 30 sec, 72°C, 90 sec) × 35 cycles, 72°C, 5 min]とした。増幅産物を、pGEM T-easy にクローニングし、コンストラクト作製の鋳型となる *miR319a/pGEM* を得た。標的配列は、Web MicroRNA Designer (WMD3) で算出された候補より、Jian-Feng Li *et al.*, (2013) の基準を考慮して選抜し、プライマーは WMD3 の oligo ツールを用いて設計した。*miR319a/pGEM* を鋳型として、ヘアピン構造の上流側基部 (a)、ヘアピン部分 (b)、下流側基部 (c) に相当する 3 つの断片を、それぞれプライマー A および標的特異的プライマー IV、標的特異的プライマー III および II、標的特異的プライマー I および M13R (Table S1) を用いて増幅した。PCR 条件は、[95°C, 5 min, (94°C 30 sec, 55°C, 30 sec, 72°C, 40 sec) × 24~35 cycles, 72°C, 7 min]とした。つぎにこれら (a)、(b) と (c) を鋳型とした PCR を、プライマー A と M13R を用いて、サイクル条件 [95°C, 5 min, (94°C, 30 sec, 55°C, 30 sec, 72°C, 90 sec) × 24~35 cycles, 72°C, 5 min]で行った。得られた断片を、*BamHI/SacI* サイトを用いて既に作製されていた *LAT52-pro::FLAG:S<sub>7</sub>-SLF2-LAT52-pro::Venus/pRI909* プラスミドに挿入し、*LAT52-pro::FLAG:amiCUL1-P-LAT52-pro::Venus/pRI909*、および *LAT52-pro::FLAG:amiCUL1-G-LAT52-pro::Venus/pRI909* を得た。

## 形質転換体の作出

ペチュニアの形質転換当代 (T<sub>0</sub>) の作出は、Jorgensen (1996) らのアグロバクテリウム法を一部改変して行った。

植物形質転換用プラスミド約 100 ng を、凍結した *Agrobacterium tumefaciens* pMP90 へ添加し、37°C 5 min ヒートショック後、1 mL SOC を添加、16°C 180 rpm 2 時間回復培養を行った後、耐性の抗生物質を含むプレートに播き、シングルコロニーを取得した。得られたコロニーは、導入遺伝子特異的プライマーを用いた PCR により、標的遺伝子の導入を確認した。

得られたコロニーを、2×YT 培地 (Bact tryptone 16 g/L、Bact yeast extract 10 g



/L、NaCl 5 g/L) に播種し、28°C、180 rpm で一晩培養した。

栄養成長期のペチュニア個体から 3-5 cm 長の展開葉を採取し、MilliQ 水で 3 度洗った後、1%次亜塩素酸ナトリウム、0.1% Triton-X100 で 10 分間表面殺菌した。滅菌した葉を、OD<sub>600</sub> 約 0.1 の菌懸濁液中で 5 mm×5-8 mm 断片に切断しながら、その断面よりアグロバクテリウムを接種した。これら植物片の培養には、基本培地 (BSM) [1×ムラシゲスクーグ培地用混合塩類、3%スクロース、0.5 g/L MES(2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸)、1×MS ビタミン、2.5 g/L ゲランガム、pH5.8]を用いた。切断した植物片を、ろ紙を敷いた共存培地 (BSM に 0.25 μM インドール酢酸(IAA)、2.5 μM ベンジルアミノプリン(BAP)を添加) に置床し、遮光下 48 時間共存培養し、感染させた。

植物片を共存培地から取り出し、選抜/再分化培地 (BSM に 0.25 μM IAA、2.5 μM BAP、300 μg/mL カルベニシリン、150 μg/mL カナマイシン硫酸塩を添加) に移した。24°C、16 時間明期/8 時間暗期条件下で 14 日間培養した。その後、誘導されたカルスを再度選抜/再分化培地に移し、さらに再分化が誘導されるまでおよそ 21 日間培養した。

再分化したシュートを、ホルモンフリー培地 (BSM に 300 μg/mL カルベニシリンを添加) へ移し、24°C で 14 日間、16 時間明期/8 時間暗期条件下で培養し、シュートの生育を促した。

生育したシュートを切り出し、選抜/発根培地 (BSM に、2 μM インドール酢酸(IBA)、300 μg/mL カルベニシリンを添加) で 24°C、16 時間明期/8 時間暗期条件下で 14 日間培養し、発根を誘導した。発根したシュートは、ジフィーセブン (サカタのタネ) に移植し、10 日間かけて低湿度条件への馴化、育苗の後、培養土を加えたポットに移植して温室で栽培し、実験に用いた。

## 形質転換体における導入遺伝子の検出

形質転換当代および後代における各種導入遺伝子の有無および内在遺伝子の遺伝子型について、特異的プライマー (Table S1) を用いた PCR によって決定した。鋳型ゲノム DNA は、約 3 mm 角の若い葉、または 1/2 濃度で調製した BSM に無菌播種後 14 日前後の芽生えの子葉を、抽出バッファー (0.1 M Tris、1 M KCl、0.01 M EDTA、pH9.5) 内でチップ先端で突いて破碎し、95°C 5 分間加熱したものを TE バッファーで 10 倍希釈することで調製した。PCR 反応は、KAPA 3G Plant PCR kit (日本ジェネティクス) を用いて添付の手法に従い、サイクル条件は[95°C, 5 min, (94°C, 20 sec, 55°C, 20 sec, 72°C, 90 sec) × 40 cycles, 72°C, 5 min]で行った。

## 導入遺伝子座位数の算出

*Venus* の発現に由来する緑色蛍光を観察し、蛍光を有する花粉の割合から、導入遺伝子座位数を算出した。観察は、水銀ランプユニット HB100 を装備した蛍光顕微鏡 Axioplan2 (Zeiss) で、フィルターセット 10 (励起波長 450-490 nm、蛍光波長 515-565 nm, Zeiss) を用いて行い、CCD カメラ (AxioCam MRc5, Zeiss) で撮影した。*Venus* 蛍光がすべての花粉に見られる個体は、導入遺伝子の挿入についてホモ接合の個体として扱った。

## 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

*CUL1* 遺伝子群の器官別定量リアルタイム (RT) -PCR に使用する total RNA は、*P. hydrida* (*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>*) の雌ずい、葉、茎、根、および 1、2、3、4、5.5 cm の長さのつぼみの葯および成熟花粉より抽出した。*CUL1-P<sup>DN</sup>*, *-G<sup>DN</sup>* 形質転換体における導入遺伝子の発現確認には、花粉もしくは 3 cm つぼみの葯から total RNA を抽出した。total RNA は、RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、使用説明書に従い抽出・精製した。得られた total RNA 画分は、RNase-free DNaseI (Qiagen) を加え、室温 30 分間インキュベートすることで、DNA を除去した。NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (スクラム) を用い、吸光度 ( $\lambda = 260$  nm) より濃度を算出した。抽出した total RNA より、SuperScript®III (Invitrogen) を使用説明書に従って用い、oligo-dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。

定量 PCR を行うに先立ち、それぞれの標的遺伝子に対する定量用標準サンプルを得るため、特異的プライマーセット (Table S1) による増幅ターゲットをクローニングしたプラスミド DNA を調製した。まず、各特異的プライマーセットを用い全長 cDNA クローン、または花粉 cDNA 10 ng を鋳型として用いて PCR を行い、増幅断片を得た。PCR 反応には Ex-Taq を用い、サイクル条件は [95°C, 5 min, (94°C, 15 sec, 55°C, 15 sec, 68°C, 15 sec) ×40 cycles, 68°C, 5 min] とした。次に得られた PCR 産物を pGEM T-easy (Promega) にクローニングし、それぞれの遺伝子断片を含んだプラスミド DNA 溶液を調製した。

One-step Real-time PCR は、QuantiFast™ SYBR Green PCR kit (Qiagen) を用い、添付のプロトコールに従い行った。テンプレートとして 10 ng の total RNA を反応溶液 10  $\mu$ L に加え、Table S1 にリストした特異的プライマーセットを用い、LightCycler®480 System I (Roche) を用いて、定量 RT-PCR を行った。転

写物の絶対量を定量する場合には、検量線用標準サンプルとしてプラスミド DNA 溶液の希釈系列 ( $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$  fg) を鋳型として用いた。相対定量の場合には、内部標準として *Ubiquitin* を用いた。反応のサイクル条件は、*CUL1* 遺伝子群の器官別定量では [95°C, 5 min, (95°C, 10 sec, 60°C, 30 sec)  $\times$  50 cycles, 95°C, 5 sec, 65°C, 15 sec, 98°C, continuous, 50°C 10 sec]、*CUL1-P<sup>DN</sup>*、*-G<sup>DN</sup>* 形質転換体における導入遺伝子の発現確認および *amiCUL1s* 形質転換体における内在 *CUL1* 遺伝子への RNAi 抑制効果の確認には [50°C, 30 min, 95°C, 5 min, (95°C, 10 sec, 60°C, 30 sec)  $\times$  40 cycles, 95°C, 5 sec, 65°C, 15 sec, 98°C, continuous, 50°C 10 sec] とした。データ解析には、LightCycler®480 Software release 1. 5. 0 SP4 Version 1. 5. 0. 39 を用いた。

## 抗 *CUL1-P* および *-G* 特異的抗体の作製

*CUL1-P* の N 末端配列 (MAEEAEKIIIELEEGMEC)、および *CUL1-G* の N 末端配列 (MTIKQMNNIELEDGWEFM ; Fig 1-2 参照) をそれぞれ抗原ペプチドとしてウサギポリクローナル抗体を作製し、それぞれの抗原を用いたペプチドカラムで精製して、抗 *CUL1-P* および *-G* 特異的抗体を得た (SIGMA に委託)。

## *CUL1-P<sup>DN</sup>*、*-G<sup>DN</sup>* 体のタンパク質発現解析

導入した N 末端発現タンパク質および内生タンパク質の発現を、抗 *CUL1-P* または *CUL1-G* 特異的抗体を用いたウェスタンブロットにて観察した。

長さ 3 cm つぼみの蒴または成熟花粉を液体窒素で凍結し、タンパク質抽出バッファー [20 mM HEPES/NaOH、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH7.5] 内ですりつぶし、遠心 (13,000 rpm、15min、4°C) し、上清を回収した。タンパク質定量は、Bio-Rad Protein assay (BIO-RAD) 添付の手法に従い、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) により吸光度 595 nm で行った。

*CUL1-P<sup>DN</sup>* 発現株は花長 3 cm の蒴または花粉抽出液 1  $\mu$ g、*CUL1-G<sup>DN</sup>* 発現株は 5  $\mu$ g に SDS-PAGE sample buffer を加え、96°C、5 分間処理したものを SDS-PAGE (5-20% グラジエント) で分離し、セミドライ法ブロッティング装置 (BIO-RAD) により、ブロッティングバッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol、1% SDS) を用いて 20 V 定電圧で 1 時間、0.22  $\mu$ m PVDF メンブレン (ATTO) にタンパク質を転写した。

転写後のメンブレンを、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO) で、室温、1 時間ブロッキングした。Can Get Signal® Solution 1 (TOYOBO) で

4,000 倍に希釈した一次抗体の抗 CUL1-P もしくは抗 CUL1-G 抗体溶液に浸し、室温 1 時間反応させた。T-TBS でメンブレンを 4 回洗浄し、Can Get Signal® Solution 2 (TOYOBO) で 4,000 倍に希釈した標識二次抗体 anti-rabbit IgG HRPconjugate (BIO-RAD) に浸し、室温 1 時間反応させた。T-TBS でメンブレンを洗浄後、シグナルは ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて、Hyperfilm ECL (GE Healthcare) に感光後、自動現像機 CEPROS-SV (富士フィルム) により現像、もしくは ImageQuant LA-4000 (GE Healthcare) で検出した。

### ***amiCUL1* 形質転換体における内生 CUL1-P および-G の発現解析**

RNAi 発現抑制体で導入遺伝子をホモにもつ T<sub>1</sub> 個体を用いて、標的遺伝子に由来するタンパク質の発現をウェスタンブロットにより解析した。花粉より抽出したタンパク質を試料として、それぞれに特異的な抗体を用いたウェスタンブロットで上述と同様に検出した。

### ***amiCUL1* 花粉管の稔性の観察**

花粉管壁のカロースをアニリンブルーによって特異的に蛍光染色して観察し、*amiCUL1* 花粉管の伸長を観察した。開花前日に除雄した花の雌ずいに対して、開花直後に導入遺伝子がホモ接合の RNAi 発現抑制体の花粉を授粉した。24 時間もしくは 48 時間後に花柱を採取し、固定液 (酢酸:エタノール=1:3) に室温で一晩浸し固定した。1N NaOH 溶液に 65°C で 8 時間浸し、花柱組織を柔軟化した。アニリンブルー染色液 (2% K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01%アニリンブルー) に入れ替え、遮光して室温で一晩静置して染色した。50%グリセロールを用いてスライドガラス上にマウントし、カバーガラスで花柱を軽く押し潰した。水銀ランプユニット HB100 を装備した蛍光顕微鏡 AxioPlan2 (Zeiss) で、フィルターセット 01 (励起波長 365 nm、蛍光波長 397 nm ; Zeiss) を用いて花柱内の花粉管を観察し、CCD カメラ (AxioCam MRc5, Zeiss) で撮影した。

### ***CUL1-P<sup>DN</sup>* または *-G<sup>DN</sup>* と SLF 間の *in vivo* 相互作用解析**

*CUL1-P<sup>DN</sup>-6/S<sub>5</sub>S<sub>17</sub> × FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2/S<sub>5</sub>S<sub>9</sub>, CUL1-G<sup>DN</sup>-3/S<sub>5</sub>S<sub>17</sub> × FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2/S<sub>5</sub>S<sub>9</sub>* 交配に由来する種子を取得し、Table S1 にリストした特異プライマーを

用いて PCR ジェノタイピングを行い、両親から導入遺伝子を受け継いだ後代を選抜した。*CUL1-P<sup>DN</sup>-6-FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2 (S<sub>5</sub>S<sub>9</sub>)*、*CUL1-D<sup>DN</sup>-3-FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2 (S<sub>9</sub>S<sub>17</sub>)* を得た。これらの個体の花粉タンパク質を用い、抗 FLAG 抗体による FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2 との共免疫沈降を行った。

5~10 花分の花粉をタンパク質抽出バッファー[20 mM HEPES/NaOH、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH7.5]内ですりつぶし、遠心 (13,000 rpm、15min、4°C) し、上清を回収した。タンパク質定量は、Bio-Rad Protein assay (BIO-RAD) 添付の手法に従い、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) により吸光度 595 nm で行った。

前日に、ANTI-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (SIGMA) に対して 5 倍量のビーズブロッキングバッファー (50 mM Tris-HCl、5% Polyvinylpyrrolidone、pH8.0) を加えて洗浄後、4°C、500 rpm、30 sec で遠心して上清を除去した。この作業を 2 回行い、5 倍量の同バッファーを加え、4°C、一晚混合した。4°C、500 rpm、30 sec で遠心して上清を除去し、5 倍量の氷冷 HBS (20 mM HEPES-NaOH、150 mM NaCl、pH7.5) を加え混合後、4°C、500 rpm、30 sec 遠心して上清を除去した。この作業を 3 回行い、最後に ANTI-FLAG M2 Agarose Affinity Gel と同量の HBS を加え、50%スラリーとして 4°Cに保管した。

調製した 50%スラリーに氷冷 HBS1 mL を加えて混合、4°C、500 rpm、30 sec で遠心して上清を除去した。花粉タンパク質を 1 µg 加えて 4°C、15 分間混合した溶液を、Pierce<sup>®</sup> Spin Cups-Paper Filter (Pierce) に混合溶液を添加し、4°C、500 rpm、30 sec で遠心して、スルー画分を捨てた。氷冷した 500 µL の洗浄バッファー (20 mM HEPES、150 mM NaCl、0.1% Triton-X100、pH7.5) を加え、混合後 4°C、500 rpm、30 sec で遠心しスルー画分を捨てた。この作業を 5 回行った後、50 µL 0.5 mg/mL の FLAG ペプチド (SIGMA) を含む洗浄バッファーを加えて、時折混合しながら 5 分間氷上においた後、4°C、500 rpm、30 sec で遠心して溶出した。CUL1 タンパク質の検出は特異的抗 CUL1-P および-G 抗体を用いたウェスタンブロットにより前述同様に行った。

## 大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質発現用コンストラクトの作製

CUL1 と相互作用する SSK1 (Skp1) の発現コンストラクトとして、当研究室で既に作製されていた His-SSK1/pET47b(+)を、SLF は S<sub>7</sub>-SLF2 と S<sub>5</sub>-SLF3 の F-box ドメインを含む N 末端 1-52、53 アミノ酸を発現するコンストラクトとして His-SLF3-F (1-53 amino acids) /pCDFDuet、His-SLF2-F (1-52 amino acids) /pCDFDuet を用いた (村瀬、未発表)。

5つの CUL1 を GST 融合タンパク質として発現した。ヒトの SCF<sup>Skp2</sup> 複合体の結晶構造解析結果 (Zheng *et al.*, 2002) を参考に、Skp1 および F-box との相互作用領域を含むと推測される N 末端アミノ酸 (CUL1-P, 1-380 amino acids; B, 1-380 amino acids; C, 1-381 amino acids; E, 1-379 amino acids; G, 1-379 amino acids) に、可溶化を目的とした変異 (CUL1-P, V342D と F350D; B, V342D と F350D; C, V340E と I348E; E, V342E と I450E; G, I341E と I349E) を導入した発現コンストラクトを、以下のように作製した。

CUL1-P、G、B、E の N 末端側アミノ酸に対応する塩基配列の 5' 末端に *Bam*HI サイト、3' 末端に *Xho*I サイト、CUL1-C は 5' 末端に *Sma*I サイト、3' 末端に *Not*I サイトを付加したプライマーセット (Table S1) を用いて PCR 反応を行った。鋳型として各 *CUL1s* の全長または部分長 cDNA クローンを用いた。PCR の反応条件は、[95°C, 5 min, (94°C, 30 sec, 55°C, 30 sec, 68°C, 90 sec) ×35 cycles, 68°C, 5 min] とした。

PCR 産物をそれぞれ *Bam*HI/*Xho*I もしくは *Sma*I/*Not*I サイトを用いて pGEX-6P-3 (Promega) に導入し、CUL1X-NTD/pGEX6P-3 を得た。これらのプラスミドを精製し、Table S1 にリストしたプライマーを用いインバース PCR を行い、変異を導入した。PCR の反応条件は、[95°C, 5 min, (95°C, 50 sec, 60°C, 50 sec, 68°C, 120 sec) ×17 cycles, 68°C, 5 min] とした。得られた PCR 産物を精製し、変異未導入のプラスミドを *Dpn*I で消化した上で大腸菌に形質転換し、得られた変異後プラスミドを GST-CUL1-X-NTDm/pGEX-6P-3 とした。これらをタンパク質発現用大腸菌 Rosseta2 DE3 (Novagen) へ形質転換した。

## 大腸菌 Rosseta2 を用いたリコンビナントタンパク質の発現

ヒスチジンタグを付加した SSK1、S<sub>7</sub>-SLF3、もしくは S<sub>7</sub>-SLF2 を発現するプラスミド (His-SSK1/pET47b(+), His-SLF3-F/pCDFDuet, His-SLF2-F/pCDFDuet) は、村瀬浩司博士が作製した (未発表)。

大腸菌 rosseta2 を用いたタンパク質発現を以下のように行った。

His-SSK1/pET47b(+) と、His-SLF3-F/pCDFDuet もしくは His-SLF2-F/pCDFDuet を共形質転換した菌株は LB/KmSm 5mL にて、GST-CUL1X-NTDm/pGEX-6P-3 を形質転換した菌株は LB/Amp 5 mL 中にて、37°C、180 rpm で 16 時間振とう培養した後、培養液 500 μL を 50 mL の培地に植菌してスケールアップし、同様の条件で培養を続けた。50 mL 培養液を 1 L の培地へ添加し 30°C、120 rpm で培養し、OD<sub>600</sub>=0.6-1.0 に増殖させた。4°C で急冷後、終濃度 100 μM IPTG を添加し 16°C、120 rpm、24 時間振とうし、タンパク質を発現させ、ペレットを

回収した。

## 昆虫細胞 Sf9 を用いたリコンビナントタンパク質発現用コンストラクトの作製

昆虫細胞 Sf9 を用いて 5 個の CUL1 を GST 融合タンパク質として発現した。発現コンストラクトは、CUL1-C に対してプライマー CUL1C-CDS-F1-smaI\_pFast および CUL1C-NTD-NotI-R (Table S1) を用いた以外、大腸菌発現用コンストラクト同様に作製した。

精製 PCR 産物を、pFastBac (Invitrogen) に GST 遺伝子を導入した pFastBacGST-Mori (箱嶋研より供与) に *Bam*HI/*Xho*I もしくは *Sma*I/*Not*I サイトを用いてクローニングし、GST-CUL1X-NTD/pFastBac を得た。これらのプラスミドにも、大腸菌発現用コンストラクト同様にインバース PCR によって変異を導入し、GST-CUL1X-NTDm/pFastBac とした。得られたプラスミドを精製し、MAX Efficiency DH10Bac (Invitrogen) コンピテントセルへ形質転換し、得られたコロニーから GST-CUL1-X-NTDm/Bacmid を精製した。

## 昆虫細胞 Sf9 を用いた GST 融合 CUL1-X-NTDm タンパク質発現

12 well tissue culture treated plate (Funakoshi) へ  $4 \times 10^5$ /mL の Sf9 細胞を 1 時間程度静置し接着させ、Sf-900II(-)FBS (Invitrogen) 培地で洗浄し、5  $\mu$ L GST-CUL1-X-NTDm/Bacmid プラスミドと 200  $\mu$ L の Sf900 II (-)FBS 培地、6  $\mu$ L の Cellfectin (Life technologies) を混合し 1 時間室温に静置後に、800  $\mu$ L Sf900 II (-)FBS と混合したものを添加し、28°Cモイストチャンバーにて 2 日間静置した。2 日後、培地を除去し、10  $\mu$ L Antibiotic Antimycotic (Life technologies) を含む 1 mL Sf900 II (+)FBS 培地に置換し、28°C1 週間静置後、回収し P1 ウイルスストックとした。

25 cm<sup>2</sup> coated flask (Corning) へ 5 mL の培地を添加し、 $1 \times 10^6$ /mL の Sf9 を接着させ、100  $\mu$ L の P1 ウイルスストックを添加し、28°C7 日間静置し、ウイルスを増殖させた後、遠心 (3,000 rpm、5min)、上清を回収、P2 ウイルスストックとした。

175 cm<sup>2</sup> coated flask (Corning) へ 50 mL の培地を添加し、 $1 \times 10^6$ /mL の Sf9 を接着させ、500  $\mu$ L の P2 ウイルスストックを添加し、28°C7 日間静置し、ウイルスを増殖させた後、遠心 (3,000 rpm、5min)、上清を回収、P3 ウイルスストックとした。

500 mL 三角フラスコ (Corning) へ 100 mL の培地、 $1 \times 10^6$ /mL の Sf9 に対して 5 mL の P3 ウイルスを添加、23°C、140 rpm で 3 日間振とう培養した後、遠心 (3,000 rpm、5min)、ペレットを回収した。

### His タグ融合リコンビナントタンパク質の回収と精製

共発現した His-SSK1 と His-SLF3-F もしくは His-SLF2-F のペレットを、[20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、complete protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche)] に懸濁し、超音波破碎後、遠心 (14,000 rpm、30 min、4°C) し、上清を可溶性画分として回収した。これを、超遠心 (35,000 rpm、30 min、4°C) し、さらに膜画分や不溶性画分を除去した。可溶性画分に 10 mM イミダゾールを添加し、6×His 融合タンパク質を、Ni<sup>+</sup>-NTA-agarose (ナカライテスク) に吸着させた後、20 mM イミダゾールで 2 回洗浄、同 250 mM で溶出した。His-SSK1 と His-SLF3-F もしくは His-SLF2-F は、PD10 Desalting Columns (GE Healthcare) を用いて Gravity protocol により 20 mM Tris-HCL (pH 8.0)、100 mM NaCl にバッファー置換後、タンパク質定量は、Bio-Rad Protein assay (BIO-RAD) 添付の手法に従い、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) により吸光度 595 nm で行った。

His-SSK1 は、村瀬浩司博士により以下のように精製されたものを用いた。溶出したタンパク質を、HiTrapQ HP (GE Healthcare) を用いて陰イオンクロマトグラム精製した。その後、HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) カラムを用いて AKTA explorer100 (GE Healthcare) で、ゲル濾過で精製した。分画は、[20 mM Tris-HCL (pH 8.0)、100 mM NaCl] で平衡化したカラムに同溶液を流速 1.5 mL/min で Fraction collector Frac-950 (GE Healthcare) を用いて行い、トータルイオンクロマトグラムおよび、SDS-PAGE により目的のタンパク質を発現している画分を確認、回収し、AmiconUltra 10,000NMWL (Millipore) を用いて濃縮した。同様にタンパク質定量を行った。

### GST 融合リコンビナントタンパク質の回収と精製

GST-CUL1-NTDm タンパク質を発現した昆虫細胞 Sf9 のペレットを、[20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、1% TritonX-100、3%グリセロール、complete protease inhibitor cocktail (Roche)] に懸濁し、超遠心 (35,000 rpm、30 min、4°C) した。上清を 50 μL Glutation Sepharose 4B (GE Healthcare) に添加し、4°C、30 分間、穏やかに回転反応し、GST 融合タンパク質を吸着させた後、[20 mM Tris-HCl



(pH 8.0)、100 mM NaCl]で、3回洗浄し、[20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM DTT、3%グリセロール]で 50%スラリーに調製した。

### 共免疫沈降法による SSK1-CUL1-SLF-F-box 間の相互作用解析

発現した His-SSK1 と His-SLF3-F もしくは His-SLF2-F と、GST-CUL1X-NTDm の相互作用解析として、共免疫沈降を行った。

Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare)に結合させた 10-30 mL 培養液相当の GST-CUL1X-NTDm に、20 µg の His-SSK1 または、共発現した His-SSK1 と His-SLF-F を加えて、計 100 µL の[20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM DTT、3%グリセロール]で 4°C、24 時間穏やかに攪拌した。懸濁液を遠心 (400 rpm、1 min、4°C)し、上清を除去後、[20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl] でビーズを 3 回洗浄した。50 µL の溶出液[100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、10 mM 還元型グルタチオン]を加えて、5 分間穏やかに攪拌し、GST 融合タンパク質を計 5 回溶出した。タンパク質抽出液に SDS-PAGE sample buffer を加え、95°C 5 分間処理したものを SDS-PAGE (5-20%) で分離し、セミドライ法ブロッキング装置 (BIO-RAD) により、EzFastBlot (Atto) を用いて 25 V 定電圧で 20 分間、0.22 µm Immobilon-P<sup>SQ</sup> (Millipore) にタンパク質を転写した。

転写後のメンブレンを、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO) で、室温、1 時間ブロッキングした。Can Get Signal® Solution 1 (TOYOBO) で 4,000 倍に希釈した一次抗体溶液に浸し、室温 1 時間反応させた。T-TBS でメンブレンを 4 回洗浄し、Can Get Signal® Solution 2 (TOYOBO) で 4,000 倍に希釈した標識二次抗体 anti-rabbit IgG HRPconjugate、anti-mouse IgG HRPconjugate (BIO-RAD) に浸し、室温 1 時間反応させた。T-TBS でメンブレンを洗浄後、シグナルの検出は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて、ImageQuant LA-4000 (GE Healthcare) で検出した。

## 1-3 結果

### *P. hybrida* 花粉および葯で発現する *CUL1* 分子種の特定

これまでの研究から、ペチュニアにおける複数の *CUL1* 遺伝子の存在が示唆されている。Hua と Kao (2006)、および Zhao ら (2010) は、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体の構成成分として *CUL1-G* を同定したが、当研究室で SLF 複合体として精製された *CUL1* の MS フラグメントはこれとは一致しなかった。円谷らは *CUL1-P* を同定したが、ペチュニアの花粉において発現している全 *CUL1* についての情報が無かったため、これが SCF<sup>SLFs</sup> 構成成分として唯一の *CUL1* であるのか判らなかつた。ペチュニアは全ゲノム情報が得られていないことから、まず始めにトランスクリプトームデータを用い、*CUL1* 配列の網羅的探索を行うことにした。次世代シーケンサー454を用いて当研究室で作製された *S*<sub>5</sub>-、*S*<sub>7</sub>-、*S*<sub>9</sub>-、*S*<sub>11</sub>-、*S*<sub>17</sub>-ホモ系統の雄性生殖器官トランスクリプトームデータから *CUL1* に相同性をもつ配列を抽出して、アセンブルを行ったところ、5種類の *CUL1* cDNA (*CUL1-P*、*-B*、*-C*、*-E*、*-G*) が見いだされた (Fig. 1-2)。これらのうち、*CUL1-C*、*-G* は既に *P. hybrida*、*P. inflata* で同定されていたものであり (Hua *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010)、*CUL1-P* はトマトの *SpCUL1* に近いものであった。一方、*CUL1-B*、*-E* は新規の *CUL1* 遺伝子であった。次に、MS 解析から得られたペプチドフラグメントについて、これらの *CUL1* にサーチしたところ、ヒットした34のフラグメントのうち、配列が保存されているため帰属できなかったものを除く14のフラグメントがすべて *CUL1-P* と一致し、*CUL1-P* が SLF と複合体を形成する主要な *CUL1* であることが示唆された。これらの推定アミノ酸配列アライメントより、*CUL1-P* に対してそれぞれの分子種とのアミノ酸配列同一性を調べた結果、*CUL1-B* に対しては約 85%、*-C*、*-E*、*-G* に対しては約 50%程度であった。

### ナス科 *CUL1* 遺伝子の系統解析

次に、前項で得られた5つの *CUL1* 遺伝子 (*PhCUL1-P*、*-B*、*-C*、*-E*、*-G*) について分子進化学的な類縁関係を推測するため、マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 法を用いて、データベースに登録されているナス科の *CUL1* と共に全長アミノ酸配列による分子系統樹を作製した (Fig 1-3)。その結果、ナス科において *CUL1*s は *CUL1-P/B*、*-C*、*-E*、*-G* と名付けた4種のクレードに大別され、今回 SCF<sup>SLFs</sup> 複合体の構成成分として検出された *PhCUL1-P* は *CUL1-P/B* クレー

ドに分類された。また、トマト種間不和合性において機能する *SpCUL1* は同じ CUL1-P/B グループに属するが、他の研究グループが SCF<sup>SLFs</sup> 複合体の構成成分であると主張している *PhCUL1*、*PiCUL1-G* は進化的に大きく離れた CUL1-G クレードに属していた。

CUL1-P/B クレードには S-RNase 型自家不和合性を持つことが知られる *Petunia*、*Solanum*、*Nicotiana* 属のそれぞれに由来する *CUL1s* が見つかったが、CUL1-G クレードは *Petunia* 属由来の *CUL1s* のみが分類され、*Solanum* (自家不和合性の *S. penelli*、*S. habrochaites* を含む)、*Nicotiana* 属については登録されているゲノム配列中に存在しなかった。ナス科の自家不和合性種では SLF と複合体を形成する CUL1 も保存されていることが期待されることから、SLF と複合体を形成する CUL1 は CUL1-G よりも CUL1-P であることが最もらしいと考えられた。CUL1-B については、上述の SCF<sup>SLFs</sup> 構成成分の MS 解析では特異的ペプチドフラグメントは検出されなかったものの、同じ CUL1-P/B クレードに属することから、CUL1-P と冗長な機能をもつ可能性が予想された。

## CUL1 分子種の器官別遺伝子発現解析

これまでの研究から、*SSK1* および *SLF* は、花粉および葯で特徴的な発現パターンを示す事が知られている (Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Kubo *et al.*, 2010, 2015)。これらの結果は、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体が自家不和合性に特化して進化した可能性を示唆しており、自家不和合性に関わる CUL1 も同様な発現パターンを示すことが期待される。そこで、*CUL1-P* を含む 5 つの *CUL1s*、*SSK1*、および *SLF* を代表して *S<sub>5</sub>-SLF18* それぞれについて器官別、発達ステージ別に定量 PCR を行い、転写物量を算出した (Fig. 1-4)。

結果、*CUL1-B* は調べたすべての器官で一様に低い発現を示し、*CUL1-C*、*-E*、*-G* は全身でおおむね同程度の発現を示した。一方 *CUL1-P* のみが花粉、特に発達段階の葯において、他器官と比較して特異的に高い発現量を示した。

また、*SSK1* と *S<sub>5</sub>-SLF18* もこれまでの報告と同様に発達段階の葯および花粉において特異的に高く発現していることがわかり、*CUL1-P* と類似した発現パターンであった。発現ピーク時の *CUL1-P* と *SSK1* の絶対量はほぼ同程度であり、複合体形成に矛盾しない。また、*S<sub>5</sub>-SLF18* の発現量は *CUL1-P* と *SSK1* の 10%程度であったが、*SLF* が 18 種類あることを考慮すると妥当な発現量と思われる。このように、*CUL1-P* は自家不和合性特異的に機能する *CUL1* として期待される発現パターンを示した。*CUL1-P* と冗長的に機能する可能性のあった *CUL1-B* はその発現量から、遺伝子機能がほぼ損なわれていることが示唆され

た。

## 形質転換体を用いた *CUL1-P* の機能解析

これまでの結果は SLF と複合体を形成する主要な *CUL1* は *CUL1-P* であることを支持している。そこで、形質転換実験による *CUL1-P* の機能解析を行うことにした。ペチュニアは非モデル植物であるため、アンチセンスや RNAi 等のノックダウン実験を行うのが一般的であるが、他の *CUL1* が冗長的に機能する可能性も残されているため、*CUL1-P* 単独のノックダウンでは表現系が現れない可能性が考えられた。一方、ドミナントネガティブ型タンパク質の過剰発現は、冗長性があっても遺伝子機能の確認が可能である。SCF 複合体において、*CUL1* の N 末端ドメインには基質を認識する F-box と Skp1 が結合し、C 末端側に E2 ユビキチン結合酵素を誘導する Rbx1 が結合するため、N 末端ドメインのみを発現させるとユビキチン化が起こらない複合体を形成すると考えられる。そのため、*CUL1* の N 末端ドメインを過剰発現させて、ネイティブの *CUL1* と競合させることにより、SCF 複合体の機能を阻害できることが知られている

(Jin *et al.*, 2005; Voigt and Papalopulu, 2005; Rechem *et al.*, 2011)。そこで本研究では、*CUL1-P* の機能欠失型 N 末端発現体およびノックダウン体を作製し、機能解析を行うことにした。また、これまで SLF と相互作用することが報告されている *CUL1-G* についても同様の実験を行い、その機能を検証した。

### 1. *CUL1-P* および *-G* の機能欠失型 N 末端発現体を用いた機能解析

Jin らの手法を参考にして、葯および花粉特異的で強いプロモーター活性をもつトマト *LAT52* プロモーターに *CUL1-P* と *-G* の N 末端 422 アミノ酸領域 (*CUL1-P<sup>DN</sup>*, *CUL1-G<sup>DN</sup>* と表記する) と蛍光タンパク質遺伝子 *Venus* をタンデムに連結し、機能欠失型 N 末端発現体用のコンストラクトを作製した (Fig. 1-5) (Jin *et al.*, 2005)。これらのコンストラクトを形質転換効率の高い *S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 株へ導入し、*CUL1-P<sup>DN</sup>* と *CUL1-G<sup>DN</sup>* 導入個体をそれぞれ 6 および 2 株取得することに成功した。これらの形質転換体について、*Venus* 蛍光を発する花粉の割合を計測することにより導入遺伝子挿入座位数を予測したところ、それぞれ 1~3 座位の導入遺伝子挿入があると見積もられた (Table 1-1, 1-2)。

得られた *CUL1-P<sup>DN</sup>* (*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>*) および *-G<sup>DN</sup>* (*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>*) の形質転換花粉を、本来和合の関係にある *S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>* 雌ずいへ他家受粉し、導入遺伝子の次世代への伝達率を調べた。例えば、1 遺伝子挿入座位数の形質転換体において、導入遺伝子が含まれ

る花粉の割合は 50%であるから、導入遺伝子の次世代への伝達率は 1 : 1 になるが、導入遺伝子が内生の SLF 複合体形成を阻害すると S-RNase の無毒化が抑制されるため、和合受粉においても花粉管が伸長できず、次世代の分離に歪みが生じると期待される。しかし、いずれの個体も次世代への伝達率に歪みは観察されなかった。(Table 1-1, 1-2)。この結果は 2 つの可能性を示し、CUL1-P および CUL1-G が自家不和合性反応に関与していない、もしくは導入遺伝子が期待した発現を果たしていないということが考えられた。

そこで、これらの形質転換個体における導入遺伝子の発現量を確認するために、葯と花粉を用いて定量 RT-PCR およびウェスタンブロットを行った。定量 RT-PCR では導入遺伝子と内生の *CUL1* を区別するために、両方が増幅される 5'-CDS と内生の *CUL1* のみが増幅される 3'-CDS の 2 カ所のプライマーを設計し (Fig. 1-6A, 7A)、*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 株をコントロールとして発現量を比較した。また、ウェスタンブロット解析を行うために、5 つの *CUL1* を区別できる N 末端 18 アミノ酸で作製したペプチド抗体を作製した (Fig. 1-2)。

*CUL1-P<sup>DN</sup>* mRNA は、内生 *CUL1-P* の発現ピークである花 3 cm の葯においてはコントロールと同程度の発現量であったが、花粉においては 100 倍程度の高い発現を示した (Fig. 1-6B)。しかしながら、花粉管で機能すると考えられる *SLF* や *CUL1-P* の mRNA が発達中の葯で発現ピークを示すことから、発達中に合成されたこれらのタンパク質が花粉に蓄積しており、花粉における RNA とタンパク質量の相関がない可能性も考えられたため、タンパク質量をウェスタンブロット解析により確認した。内生 *CUL1-P* と *CUL1-P<sup>DN</sup>* 量を比較した結果、葯においては *CUL1-P<sup>DN</sup>* が少なく、花粉においても同程度であることが観察されたため (Fig. 1-6C)、*CUL1-P<sup>DN</sup>* は内生の SLF 複合体形成を阻害するほど発現されなかったと判断された。*CUL1-G<sup>DN</sup>* も同様に花粉の RNA 量を比較したところ、野生株のわずか 2-4 倍であったが (Fig. 1-7B)、意外にもタンパク質量については、*CUL1-G<sup>DN</sup>* の顕著な発現が認められた (Fig. 1-7C)。これらの形質転換体の花粉では *CUL1-G* の機能が阻害されていることが期待されたが、表現系に変化が見られない事から、花粉におけるその機能を推測することはできなかった。

## 2. *CUL1-P* および *-G* の amiRNA による RNAi 発現抑制体を用いた機能解析

次に、amiRNA (artificial micro RNA) を用いた RNAi 法により、それぞれの *CUL1* を特異的に抑制することを計画した。amiRNA 法は microRNA の一つであるシロイヌナズナの *miR319a* を骨格とし、*miR319a* RNA が形成するヘアピン構

造のステム領域を 19 bp の目的配列に置き換えることにより、効率的に RNAi が行えるシステムである (Fig. 1-8A)。目的の *CUL1-P* もしくは *-G* のみを選択的に抑制するため、*CUL1* mRNA の 3'非翻訳領域をターゲットとした amiRNA をそれぞれ設計し (*amiCUL1-P*, *amiCUL1-G* と表記)、*LAT52* プロモーターに連結したコンストラクトを作製した (Fig. 1-8B, C)。

*amiCUL1-P* と *-G* のコンストラクトを N 末端発現体と同様にして *S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 株に導入した。また、*S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 株において、*CUL1-P* と冗長な機能を持つ可能性のある *CUL1-B* に終止コドンによる機能欠損変異が見つかったことから (久保ら、未発表)、*amiCUL1-P* については *S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 株にも遺伝子導入を行った。*amiCUL1-P* については *S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* へ導入した 4 株、*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* へ導入した 3 株が得られ、*amiCUL1-G* については、*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* へ導入した 5 株の取得に成功した。これらの形質転換体 ( $T_0$  世代) について、上述と同様にして花粉の Venus 蛍光観察から導入遺伝子座位数を予測した (Table 1-3, 6)。*amiCUL1* 形質転換体も先の実験と同様に、導入遺伝子が期待した機能を果たせば、和合受粉においても花粉管が伸長できなくなり、次世代への導入遺伝子の伝達率に歪みが生じることが期待される。

まず、*amiCUL1-P* の  $T_0$  世代花粉を、和合受粉となる *S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>* 雌ずいへ受粉し、導入遺伝子の次世代への伝達率を調べたところ、*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 形質転換体では 3 個体中 2 個体で、*S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 形質転換体では 4 個体すべてで分離に歪みが生じており、次世代へ伝達される導入遺伝子の割合が予想よりも減少していることが判明した

(Table 1-3)。この結果は導入遺伝子の発現する花粉管が和合受粉にもかかわらず、伸長阻害を受けていることを示している。*amiCUL1-P* の効果が自家不和合性ではなく花粉管の伸長そのものに影響している可能性もあることから、同花粉を *S-RNase* を欠失した自家和合株 *S<sub>0m</sub>S<sub>0m</sub>* へ受粉して、導入遺伝子の次世代への伝達率を確認した (Table 1-4)。*S<sub>0m</sub>S<sub>0m</sub>* への受粉ではすべての形質転換体で分離の歪みは観察されなかったため、*amiCUL1-P* 導入花粉管の *S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>* 花柱における伸長阻害効果は *S<sub>11</sub>-RNase* の無毒化機構が抑制されているためと考えられた。次に、この *S-RNase* 無毒化機構の抑制が他のハプロタイプでも観察できるかを調べるために、導入遺伝子 1 座位挿入の *S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 株 (*amiCUL1P-M3*) を用いて、和合受粉の関係となる *S<sub>17</sub>S<sub>17</sub>*、*S<sub>19</sub>S<sub>19</sub>* 雌ずいへ受粉し、後代への導入遺伝子伝達率を検定した結果、*S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>* 株の結果と同様に分離に歪みが観察された (Table 1-5)。これらの結果は *amiCUL1-P* 導入個体において *S-RNase* 無毒化機構の抑制、つまり複数の SLF の機能が同時に抑制されていることを意味している。

一方、*amiCUL1-G* を導入した *S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 株についても *S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>* に受粉して、次世代への導入遺伝子の分離比を算出したところ、いずれも分離比に歪みは見られず、導入遺伝子の効果は観察されなかった (Table 1-6)。

上記で得られた *amiCUL1-P* 導入個体における S-RNase 無毒化機構の抑制効果が標的遺伝子の抑制によるものであるかを確認するために、定量 RT-PCR およびウェスタンブロットにて葯および花粉での発現量を調べた。T<sub>0</sub> 個体は導入遺伝子をもたない花粉も混在しているため、まず、T<sub>0</sub> 個体を自家受粉して得た T<sub>1</sub> 個体の花粉を蛍光顕微鏡観察して、全ての花粉が Venus 蛍光を有する、導入遺伝子のホモ個体を選抜した。これらの T<sub>1</sub> 個体のうち、T<sub>0</sub> 世代の検定で分離の歪みが観察された 3 系統の子世代 7 株はすべて葯、花粉共に *CUL1-P* mRNA の強い発現抑制が観察され、花粉におけるタンパク質量も非常に低いレベルであった (Fig. 1-9A, B)。一方、分離の歪みが観察されなかった *amiCUL1-P-B7* 個体の後代については、花粉では強い mRNA 発現抑制効果あったものの、発現ピークである 3 cm 花の葯では低い抑制効果しか観察されず、タンパク質も検出された (Fig. 1-9A, B)。これらの結果は上記で観察された S-RNase 無毒化の抑制が、*CUL1-P* の発現量に依存することを示している。

*amiCUL1-G* 導入個体についても同様にして T<sub>1</sub> 導入遺伝子ホモ株を作製し、3 系統 4 株で *CUL1-G* mRNA と花粉に存在するそのタンパク質量を調べた。T<sub>1</sub> すべての個体で花粉における *CUL1-G* mRNA 量が 1/5-1/10 に抑制されていたが、花粉の *CUL1-G* タンパク質量は *CUL1-P* 程は抑制されておらず (Fig. 1-10)、発現量と表現系を関連づけることは困難であると判断された。

これまでの実験では次世代の分離比で花粉管伸長を推定していたが、*amiCUL1-P* 導入遺伝子ホモ株を用いる事で花柱を伸長中の花粉管を観察することが可能になった。そこで、異なる形質転換株を親とする *S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 導入遺伝子ホモ T<sub>1</sub> 世代 2 個体について、和合受粉の関係にある *S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>*、*S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>*、*S<sub>17</sub>S<sub>17</sub>*、*S<sub>19</sub>S<sub>19</sub>* 雌ずいへ受粉し、24、48 時間後の花粉管伸長をアニリンブルー染色により観察した。*amiCUL1-P* 導入花粉は程度の差はあるものの、*S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>*、*S<sub>11</sub>S<sub>11</sub>*、*S<sub>17</sub>S<sub>17</sub>*、*S<sub>19</sub>S<sub>19</sub>* すべての花柱で花粉管の伸長遅延を観察することができた (Fig. 1-11)。

## SLF と *CUL1-P* の *in vivo* での複合体形成

MS 解析から得られている SLF と共沈する *CUL1* のペプチドフラグメントは *CUL1-P* と一致するものであったが、実際に *CUL1-P* が *in vivo* で SLF と複合体を形成していることを確認するために、前述の N 末端発現体 *CUL1-P<sup>DN</sup>*、*CUL1-G<sup>DN</sup>* と *FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2* 導入個体 (Kubo *et al.*, 2010) を交配して、両者を有する後代を作製し、共免疫沈降実験を行った。これらの花粉抽出液から、抗 FLAG 抗体アフィニティービーズを用いて *FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2* を精製し、共沈した *CUL1* を抗 *CUL1-P* または *-G* のペプチド抗体で検出した (Fig. 1-12A, B)。

*FLAG-S7-SLF2* のみを発現させた花粉の FLAG 溶出液からは内生の CUL1-P (86 kDa) にあたる分子量付近にバンドが観察され、*CUL1-P<sup>DN</sup>* 導入個体では内生の CUL1-P だけでなく CUL1-P<sup>DN</sup> (49 kDa) の分子量にもバンドが観察された (Fig. 1-12A)。この結果は CUL1-P が花粉の中で S7-SLF2 と複合体を形成していることを示している。また、共沈した内生 CUL1-P と CUL1-P<sup>DN</sup> の比率はインプットと大きな違いがみられなかったことから、CUL1-P の N 末端領域が SLF との複合体形成に十分であることも確認できた。*CUL1-P<sup>DN</sup>* 導入個体では *CUL1-P<sup>DN</sup>* なしの個体よりも共沈される内生 CUL1-P の量が減っており、CUL1-P<sup>DN</sup> による競合阻害効果は認められるものの、不十分であったことがわかる。一方、*CUL1-G<sup>DN</sup>* 導入個体を用いた実験では FLAG 溶出液から内生の CUL1-G だけでなく、大量発現させたはずの CUL1-G<sup>DN</sup> も検出されず、SLF との複合体形成を確認することはできなかった (Fig. 1-12B)。

### SCF<sup>SLFs</sup> 複合体構成成分のタンパク質間相互作用解析

前述より、CUL1-P と S7-SLF2 が複合体を形成していることが確認できた。ヒト SCF<sup>Skp2</sup> 複合体では、CUL1 の N 末端領域が Skp1-F-box<sup>Skp2</sup> 複合体と相互作用することがわかっている (Zheng *et al.*, 2002)。そこで、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体構成成分のタンパク質間相互作用を明らかにすることを目的として、CUL1、SSK1、SLF を用いた相互作用実験を試みた。

それぞれのリコンビナントタンパク質を作製するために、CUL1 は GST 融合タンパク質、SSK1 と SLF は His タグを付加したコンストラクトを作製した (Fig. 1-13)。CUL1-P は Zheng らの方法を参考にして、Skp1 と F-box が結合する領域を含む N 末端部位 380 アミノ酸に、2 つのアミノ酸変異 V342D、F350D を入れて安定化させたものを使用し (Zheng *et al.*, 2002)、他の CUL1 も同様にして作製した (GST-CUL1-X-NTDm と表記)。これらの GST-CUL1 は大腸菌では安定な発現ができなかったため、バキュロウイルスを用いて昆虫細胞で発現させ、Glutathione Sepharose に固定化した。また、SLF は S7-SLF2 と S5-SLF3 の F-box ドメインを含む N 末端 1-52、53 アミノ酸 (His-SLF2-F、His-SLF3-F) を使用し、大腸菌で全長の His-SSK と共発現させることで安定に発現させることができた。

共発現した His-SSK1/His-SLF-F タンパク質を精製したところ、SSK が SLF よりも強く CBB 染色されており、SSK1 の単量体も多く含まれていると予想された (Fig. 1-14A)。Glutathione Sepharose に固定化した GST-CUL1-P-NTDm と His-SSK1 もしくは His-SSK1/His-SLF-F 複合体を混合して、プルダウンを行い、抗 His 抗体で検出したところ、SLF2 および SLF3 双方で His-SSK1 および



His-SLF-F に相当するバンドを検出できたが、His-SSK1 のみの場合はシグナルは非常に弱かった (Fig. 1-14B)。この結果は CUL1-P が複数の SLF と複合体を形成できることを示しており、SSK1 は SLF と複合体になることにより、CUL1-P との相互作用が増強されることが示唆された。また、His-SSK1 よりも His-SLF-F のバンドが強く検出されているが、CBB 染色されたタンパク量と抗 His 抗体で検出したインプットのシグナルを比較すると、抗 His 抗体を用いた検出では His-SLF-F が本来の量よりも明らかに多く見えるため、GST-CUL1-P-NTDm に結合している His-SLF-F の量が多いのではなく、抗体がより強く His-SLF-F を認識するためと考えられた。次に、これらの His-SSK1/His-SLF-F 複合体が他の CUL1 と相互作用するかを検証するために、GST-CUL1-NTDm (-B, -C, -G, -E) を用いて同様のプルダウン実験を行った (Fig. 1-15)。His-SSK1/His-SLF3-F を用いたときは CUL1-P のみと相互作用が観察されたため、S<sub>5</sub>-SLF3 は CUL1-P と特異的に複合体を形成することが示唆された。一方、His-SSK1/His-SLF2-F を用いた実験では CUL1-P および-B で強い相互作用が観察され、他の CUL1 でも弱く結合していた。CUL1-B は薬と花粉ではほぼ発現していないことから (Fig. 1-4)、S<sub>7</sub>-SLF2 は CUL1-P と優先的に複合体を形成すると考えられる。これらの結果はタンパク質結合強度の観点からも、SLF が形成する複合体の主要な CUL1 は CUL1-P であることを示唆している。

## 1-4 考察

これまでに、ナス科植物ペチュニアについて提唱されていた SCF<sup>SLFs</sup> の複合体には、CUL1-G を含む典型的 SCF モデルと、SBP1 を含む非典型的モデルが存在し、コンセンサスは得られていなかった (Huang *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010)。我々の先行研究では、CUL1-P が SCF<sup>SLFs</sup> に含まれる構成成分として同定されてきたが (Entani *et al.*, 2014)、これが主要な構成成分であるとの証明は得られていなかった。本章では、自家不和合性反応に関わる SCF<sup>SLFs</sup> 複合体の CUL1 の同定とその機能を明らかにすることを目指し、葯および花粉トランスクリプトームからの網羅的探索から、3 つの新規遺伝子を含む 5 種類の *CUL1* 分子種を見出した。そのうち CUL1-P は、1. SLF と共沈した CUL1 様ペプチドフラグメントデータと配列が一致すること (Fig. 1-2)、2. 遺伝子が S-RNase 型自家不和合性をもつナス科植物で保存されていること (Fig.1-3)、3. *SLF* や *SSK1* と同様に葯と花粉で特異的な mRNA 発現パターンを示すこと (Fig. 1-4)、4. ノックダウン形質転換体では S-RNase 無毒化機構が抑制されていること (Table 1-3, -5, Fig. 1-11)、5. *in vivo* で SLF と複合体と形成すること (Fig. 1-12)、6. *SSK1*/SLF 複合体が CUL1-P に特異的もしくは優先的に結合することから (Fig. 1-14, -15)、SLF と SCF 複合体を形成して、自家不和合性で機能する主要な CUL1 であると結論づけた。一方、先に SLF の複合体を形成すると報告されていた CUL1-G についても、比較対象として一連の実験を行ったが、いずれの結果からも、自家不和合性に関わる CUL1 としてのポジティブなデータは得られなかった。

最近になって、非典型的 SCF 複合体モデルを主張していた Kao らのグループも、我々と同様のアプローチを用い、*P. inflata* において SCF<sup>SLFs</sup> と複合体を形成する構成成分として *SSK1*、CUL1-P、Rbx1 を同定したため、典型的 SCF モデルに主張を修正した (Li *et al.*, 2014)。また、野生型トマト *S. penelli* で種間不和合性に関わる遺伝子として *SpCUL1* を報告 (Li and Chetelat., 2010) した Chetelat のグループも、*Solanum* 属の *CUL1-P* オルソログであるこの *SpCUL1* の RNAi ノックダウン実験から、*CUL1-P* が自家不和合性における S-RNase の無毒化に必要であることを示した (Li and Chetelat., 2014)。これらの報告はいずれも限定的な実験データではあるが、結論は本研究を支持するものであった。

*CUL1* の分子系統学的解析からナス科植物の *CUL1* は大きく 4 つのグループに分けられ、*CUL1-P* および *-B* は同じグループに分類された。*CUL1-B* は、*-P*

と 86% のアミノ酸相同性を有すること、SLF/SSK1 複合体で CUL1-P と同程度の結合を示す SLF もあったことから、CUL1-P と冗長的に機能する可能性が残されている。実際に、次世代シーケンサーによる花粉および葯のトランスクリプトームデータでは *CUL1-B* は一部の系統で多く検出された。しかしながら、*CUL1-B* は、*S<sub>5</sub>S<sub>17</sub>* 株では極めて低い発現量であり、プロモーター活性が失われていると考えられること (Fig. 1-4)、*S<sub>m</sub>S<sub>m</sub>* 株では途中でストップコドンが入って遺伝子機能を失っているが (久保ら、未発表)、*CUL1-B* 欠損による表面的な表現型は観察できないことから、*CUL1-P* との共通祖先からの遺伝子重複によって生じ、必要性がなくなって消えつつある遺伝子であると思われる。

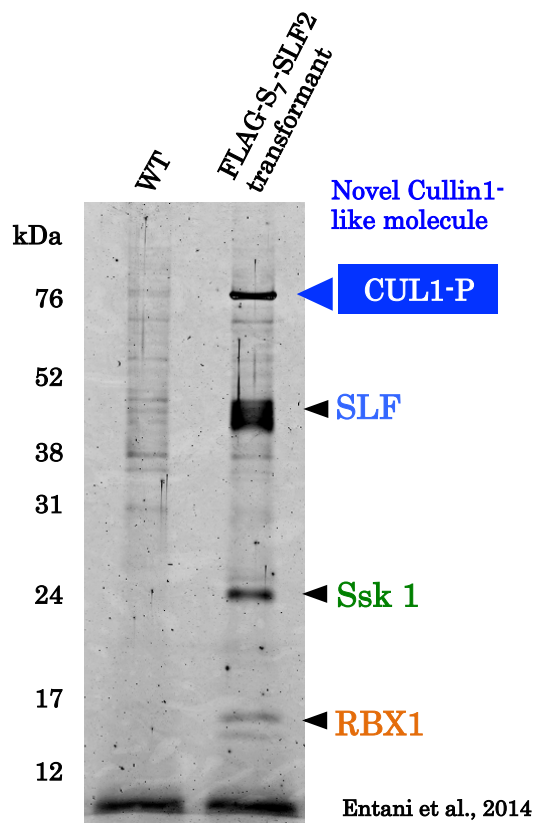
器官別発現解析の結果より、*CUL1-P* は花粉側で機能すると期待される発達後期の葯および花粉で特異的な発現パターンを示した。この発現パターンは *SLF* および *SSK1* でも同様であり (Sijacic *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010)、*SLF*、*SSK1*、*CUL1-P* は S-RNase 型自家不和合性における S-RNase の無毒化に特化した SCF 複合体として共進化してきた可能性が考えられた。系統学的にナス科とは離れているが、同じ S-RNase 型自家不和合性をもつバラ科およびオオバコ科においても、同様の発現パターンを示す *SLF* (Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003; Ushijima *et al.*, 2003) と *SSK1* (Huang *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2012; Minamikawa *et al.*, 2014) が見つかっている。一方、*CUL1* については *SLF* と複合体を形成する *CUL1* 候補がバラ科 (Matsumoto *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Minamikawa *et al.*, 2014) でも見つかっているが、いずれもライブラリー等から得られた *CUL1* を yeast two hybrid や *in vitro* 相互作用実験で確認したものであり、また、発現パターンを調べたものはいずれも全身で発現を示していることから、ナス科における *CUL1-G* と同じ経緯を辿っている。今後の研究から、バラ科やオオバコ科においても *CUL1-P* に対応する *CUL1* が見つかることを期待したい。

形質転換体における導入遺伝子の強制発現に用いたトマト (*S. lycopersicon*) の *LAT52* プロモーターは、発生後期および成熟期の花粉細胞において高い発現を示す (Twell *et al.*, 1990)。ペチュニアの花粉細胞においても 1 cm 長つぼみのステージから高く、開花直前の 5 cm 長のつぼみにおいてピークに達し、開葯直後の花粉でも高発現を維持することがわかっている (Kobayashi *et al.*, 1998)。また、同プロモーターに *Venus* を連結した花粉管伸長の観察により、花粉管での活性も確認されている (Kubo *et al.*, 2010)。*CUL1-P<sup>DN</sup>* を用いた競合阻害実験を行うための条件を満たす最も強いプロモーターと考えられたので、*LAT52* を使用したが、期待するほどの発現は得られなかった。しかしながら、ウェスタンブロット解析から内生の *CUL1-P* と *CUL1-P<sup>DN</sup>* による *SLF* の競合は観察さ

れたので、あと 5~10 倍程度のタンパク質量があれば十分な阻害ができたと推測される。今後同様の実験を設計する時はプロモーターをタンデムに並べる等、もっと発現を強くする工夫が必要と考えられた。

ヒト SCF<sup>Skp2</sup> 複合体の結晶構造解析により、複合体間相互作用アミノ酸残基が明らかになっている (Schulman *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002)。これを元に 5 つの CUL1 分子種において SCF<sup>SLFs</sup> 複合体間予想相互作用アミノ酸残基を予想した結果、CUL1-P 特異的な残基があり、SSK1 や SLF との特異的な結合に関っていると予想される。ヒト CUL1 の Skp1/F-box 相互作用に関わる 12 アミノ酸のうち、8 つは Skp1、5 つは F-box と相互作用しており (重複有り)、Skp1 との相互作用面の方が大きいことから、SCF<sup>SLFs</sup> における相互作用においても SSK1 の影響が強いと予想していたが、相互作用試験では予想に反して SSK1 のみでは CUL1-P との相互作用は弱く、CUL1-P との複合体形成には、SSK1 と SLF の両方が必要であると考えられた。また、S<sub>7</sub>-SLF2 は他の CUL1 分子種とも弱く相互作用するため、CUL1-P が不在状態では他の CUL1 を利用する可能性もある。amiRNA による *CUL1-P* ノックダウン実験で完全な不和合にならなかったのは、抑制が 100% でなかったのも理由であるが、このような CUL1s 間での補償作用が関わっているのかもしれない。

本研究により、SLF の形成する複合体に関する論争は、SLF、SSK1、CUL1-P、Rbx1 で構成される典型的 SCF 複合体に収束していくと思われる。今後はこの SCF<sup>SLFs</sup> による S-RNase のユビキチン化とユビキチン化された S-RNase の無毒化機構の解明に興味が出ていくだろう。SCF<sup>SLFs</sup> によるハプロタイプ特異的なユビキチン化は当研究室でのみ検出されているが (Entani *et al.*, 2014)、その後の S-RNase の運命はほとんど解明されていない。続く第 2 章では、分解説と隔離説の 2 つが提唱されている非自己 S-RNase 無毒化機構について、これら仮説の真偽を検証するために、和合および不和合受粉花粉管内の S-RNase 分布を抗 S-RNase 抗体および抗カロース抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により詳細に解析した。



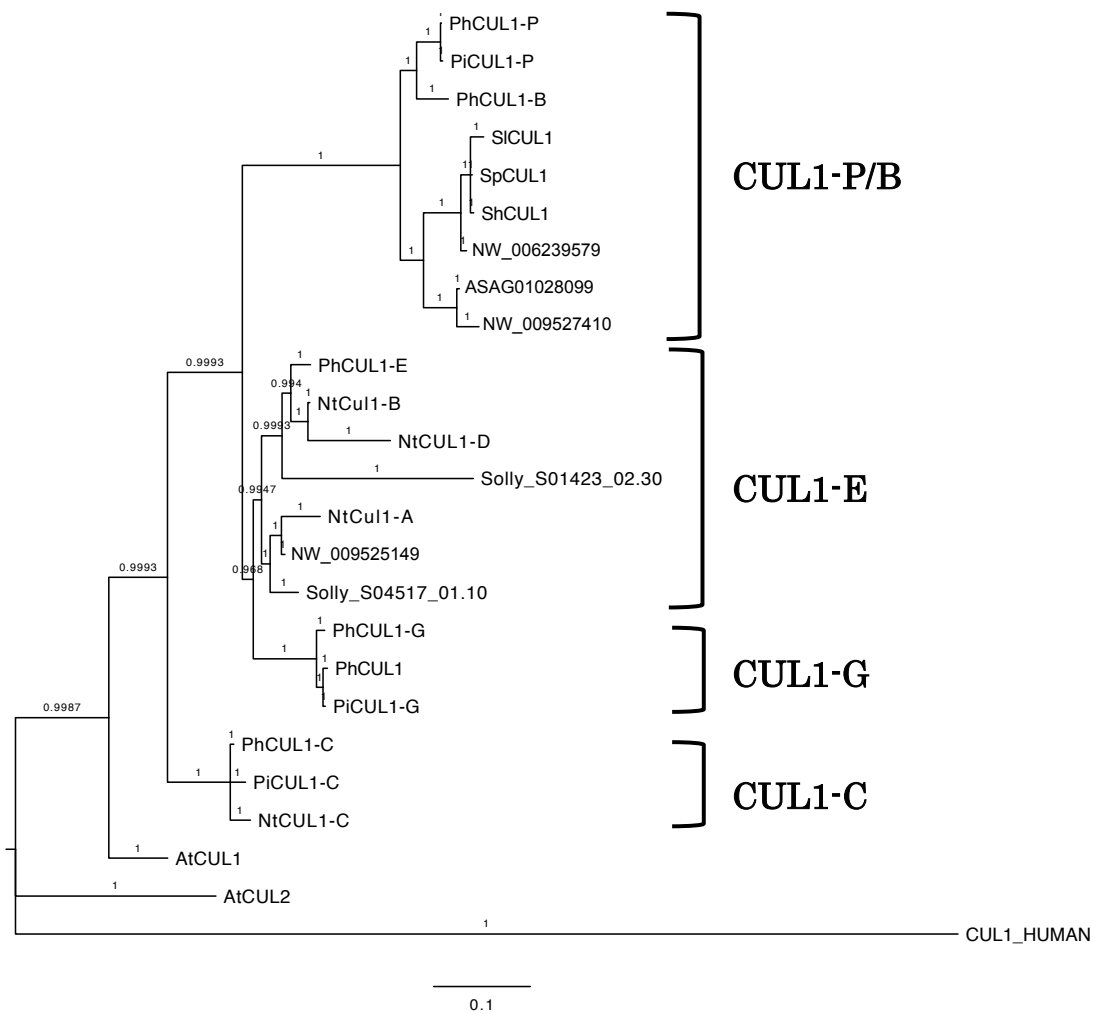
**Fig. 1-1** 花粉発現 FLAG-SLF を用いた SCF<sup>SLFs</sup> 複合体構成分子の同定

花粉発現 FLAG-S<sub>7</sub>-SLF2 を用いて SCF<sup>SLFs</sup> 複合体を回収し、得られたバンドを質量分析計に供し、既存データベースと照合したところ、典型的な SCF<sup>SLFs</sup> 複合体の構成分子として知られる RBX1、SSK1、SLF、新規 CUL1 様因子 (CUL1-P) が同定された (Entani *et al.*, 2014)。

CUL1-P	1	MAEEAEKIIIELEEGMECVKGLGKLIKIVGEPES-FTAEYVMLYTTIYNMCTQKAPH	59
CUL1-B	1	MAEETEKKIIELEEGMECVKGLSKLIKIIQGPES-FTAEYVMLYTTIYNMCTQKAPH	59
CUL1-C	1	---MNRSTEDLDQGWDFMQRGITIKLKLLEGLPEPQFSSEEDYMLYTTIYNMCTQKPPH	57
CUL1-E	1	-MAMSQMKIIELEEGWDFMQRGITIKLKLLEGGQYS-FSSEYVMLYTTIYNMCTQKPPH	58
CUL1-G	1	-MTIKQMNIELEEGWDFMQRGITIKLKLLEGSSES-FSSEYVMLYTTIYDMCTQKPPH	58
CUL1-P	60	DYSEQLYDKYEAVEDYITITIVLPSLKKKHDFMLKELEKRWASHKLMVKWLLKFFHYLD	119
CUL1-B	60	DYSQQLYDKYEAVEDYITITIVLPSLKKKHDFMLKELEKRWTSHKLMVKWLLKFFHYLD	119
CUL1-C	58	DYSQQLYDKYEAFEYITATIVLPSLREKHDFMLRELVKRWSNHKLWRLSRFFHYLD	117
CUL1-E	59	DYSQQLYDKYEAFEYINSTITVLSLREKHDFMLREFVQRWANHKLWRLSRFFHYLD	118
CUL1-G	59	DHSQQLYDKYEAFOEYINSTITVLSMREKHDFMLREFVKRWSNHKLWRLSRFFHYLD	118
CUL1-P	120	KFFIKRAEVPALNEVGLTCFRDLVYQEVKGGKATDAVIALIDDEREGEIDRALLKRVINL	179
CUL1-B	120	RFFIKRAEVPALNEVGLTCFRDLVYQEVKGRATDAVIALIDDEREGEIDRALLKRVINL	179
CUL1-C	118	RYFIARRSLPALNEVGLTCFRDQVYQELNGKVRDAVITSLIDDEREGEIDRALLKRVLDI	177
CUL1-E	119	RYFIARRSLPALNEVGLTCFRDLVYQELRGKARDAVITVLDIDDEREGEIDRALLKRVLDI	178
CUL1-G	119	RYFIARRSLPALKEVGLTCFRDLVYQELKVKGRDAVIALIDDEREGEIDRALLKRVLDI	178
CUL1-P	180	FIEMGKGMYYVNDFEAAMLRDIAAHYSRKASSWIVEDITCPPEYMLKAEELIKKEDRVS	239
CUL1-B	180	YIEMGKGMYYVNDFEAAMLRDIAAHYSRKAASWIEDSCPEYMLKAEELIKKEDRVS	239
CUL1-C	178	FVEIGMGQMDYVNDFEAAMLRDIAAAYSRKASNWIWEDSCPDYMLKAEELIKKEDRVA	237
CUL1-E	179	YVIGMGQMDYVNDFEAAMLRDIAAAYSRKASSWIWEDSCPDYMLKAEELIKKEDRVS	238
CUL1-G	179	FVEIGMGQMDYVNDFEAAMLRDIAAFYSRKAASNWIWEDSCPDYMLKAEELIKKEDRVS	238
CUL1-P	240	HYLHSSSETKLEKQVQVLLVAYTNQLLEKEDSGCRALLRDEKGEDLSRMRYLRFHKIPKG	299
CUL1-B	240	HYLHSSSETKLEKQVQVLLVAYTNQLLEKEDSGCRALLRDEKEDLSRMRYLRFHKIPKG	299
CUL1-C	238	HYLHSSSETKLEKQVHELLSVYATQLLEKESGCRALLRDKVEDLSRMRYLRFHKIPRG	297
CUL1-E	239	HYLHSSSETKLEKQVQVLLVYVYTNQLLEKESGCRALLRDKVEDLSRMRYLRFHKIPKG	298
CUL1-G	239	HYLHSSSETKLEKQVQVLLVYVHTNQLLEKESGCRVLLRDKVVDLSRMRYLRFHKIPKG	298
CUL1-P	300	LELVAEMFKQHVAAEGMVLVQAAEAANK---AENS GGSHQDFVKKAFELHDKYMYVYV	356
CUL1-B	300	LELVAEMFKQHVAAEGMVLVQAAEAANK---AESLGGSHQDFVKNAFELHDKYMYVYV	356
CUL1-C	298	LDPVANIIFKQHVTAEGTALVQAAEDAASNKKAERDVGLEQVQVFRKVIELHDKYLYAV	357
CUL1-E	299	LEPVANIFKQHVTAEGMVLVQAAETAANK---AESSGGSGEQVFRKVIELHDKYMYAV	355
CUL1-G	299	LEPVANIFKQHVTAEGMVLVQAAEDSANK---AGISSGGSEQVFRKVIELHDKYMYAV	355
CUL1-P	357	KNCFADNSIFHKALKEAFEVFCNRSVAGSSIAELLASYCDNLLKGGSEQLSDDAIETL	416
CUL1-B	357	KNCFADNSTFHKALKEAFEVFCNRSVAGSSIAELLASYCDNLLKGGSEQLSDDFEDTL	416
CUL1-C	358	NNCFQNHFLHKALKEAFEVFCNKGVAGSSIAELLATFCDNLLKGGSEQLSDEAIEDTL	417
CUL1-E	356	TDCTFNNSLPHKALKEAFEVFCNKTVAGSSIAELLASYCDNLLKGGSEQLSDDAIETL	415
CUL1-G	356	IDCFANNSLPHKALKEAFEVFCNKTVAGSSIAELLASYCDNLLKGGSEQLSDDAIETL	415
CUL1-P	417	DKAVKLVITYISDKDVFAEFYRKKLSRRLFDKSNANDEHERLILSKLQOCCGGQFTSKMEG	476
CUL1-B	417	DKAVKLVITYISEKDVFAEFYRKKLSRRLFDKSNANDEHERLILSKLQOCCGGQFTSKMEG	476
CUL1-C	418	EKVVKLLAYISDKDLFAEFYRKKLARRLLFDKSNANDEHERSILITKLLQOCCGGQFTSKMEG	477
CUL1-E	416	DKVVKLLAYISDKDLFAEFYRKKLSRRLFDKSNANDEHERLILITKLLQOCCGGQFTSKMEG	475
CUL1-G	416	DKVVKLLAYISDKDLFAEFYRKKLSRRLFDKSGNDDHERLILITKLLQOCCGGQFTSKMEG	475
CUL1-P	477	MVTDLSLVKENQNHFOEYLSNPPAANPGIDMTVTVLTTFGWPSYKSDLSLPVEMAKGVE	536
CUL1-B	477	MVTDLSLMKENQNHFOEYLSNPPAANPGIDMTVTVLTTFGWPSYKSDLSLPVEMAKGVE	536
CUL1-C	478	MVTDLTLARENQASFKEYLSNPPAANPGIDMTVTVLTTFGWPSYKSDLSLPVEMVKGVE	537
CUL1-E	476	MVTDLTLARENQNHFOEYLSNPPAASPGIDMTVTVLTTFGWPSYKSDLSLPVEMVKGVE	535
CUL1-G	476	MVTDLTLAKEQNHFOEYLSNPPAASPGIDMTVTVLTTFGWPSYKSDLSLPVEMVKGVE	535
CUL1-P	537	AFKEFYQKTKHRKLTWIYSLGQCNLNGKFEQKTIELIMGTQYQAAALLFNASDRWSYSD	596
CUL1-B	537	AFKEFYQKTKHRKLTWIYSLGQCNLNGKFEQKTIELIMGTQYQAAALLFNASDRWSYSD	596
CUL1-C	538	VFKEFYQKTKHRKLTWIYSLGTCNINNGKFDPKTIELVVTYQASALLFNASDRWSYQE	597
CUL1-E	536	VFKEFYQKTKHRKLTWIYSLGTCNINNGKFPKTIELVGTQYQAAALLFNASDRWSYSE	595
CUL1-G	536	VFKEFYQKTKHRKLTWIYSLGTCNINNGKFEAKTIELVLTQYQAAALLFNASDRWSYSD	595
CUL1-P	597	IKSELNLDGDDLVRLSSVSCAKYKILNKEPSNRTVSSSDHFEFNSEFTDKMRRIRVPLP	656
CUL1-B	597	IKSELNLDGDDLVRLSSVSCAKYKILNKEPSNRTVSSSDHFEFNSEFTDKMRRIRVPLP	656
CUL1-C	598	IMAQLNLDGDDLVRLSSVSCAKYKILNKEPSTKTIISOTDVFENSKFTDKMRRIRVPLP	657
CUL1-E	596	IKSELNLDGDDLVRLSSVSCAKYKILTKEPASRTVSSSDHFEFNSEFTDKMRRIRVPLP	655
CUL1-G	596	IKSELNLDGDDLVRLSSVSCAKYKILTKEPSNRTVSSSDHFEFNSEFTDKMRRIRVPLP	655
CUL1-P	657	PVDERKLLVEVGGKDRRYADACLVRIMKAKKVLTHQQLILECQEQLSKMFKPDKAIKK	716
CUL1-B	657	PVDERKLLVEVGGKDRRYADACLVRIMKAKKVLTHQQLILECQEQLSKMFKPDKAIKK	716
CUL1-C	658	PVDERKKVIEDVDDKDRRYADASIVRIMKSRKVLGYQLVMCEVEQLGRMFKPDKAIKK	717
CUL1-E	656	PVDERKKVIEDVDDKDRRYADACIVRIMKSRKVLPHQQLVLECQEQLSRMFKPDKAIKK	715
CUL1-G	656	PVDERKKVIEDVDDKDRRYADACIVRIMKSRKVLPHQQLVLECQEQLSRLMFKPDKAIKK	715
CUL1-P	717	RIEDLITRDYLERDLENINITYKYHA	741
CUL1-B	717	RIEDLITRDYLERDLENINITYKYBA	741
CUL1-C	718	RIEDLITRDYLERDKDNPILFKYBA	742
CUL1-E	716	RIEDLITRDYLERDKENPNLFKYBA	740
CUL1-G	716	RIEDLITREYLERDRENPNVFKYBA	740

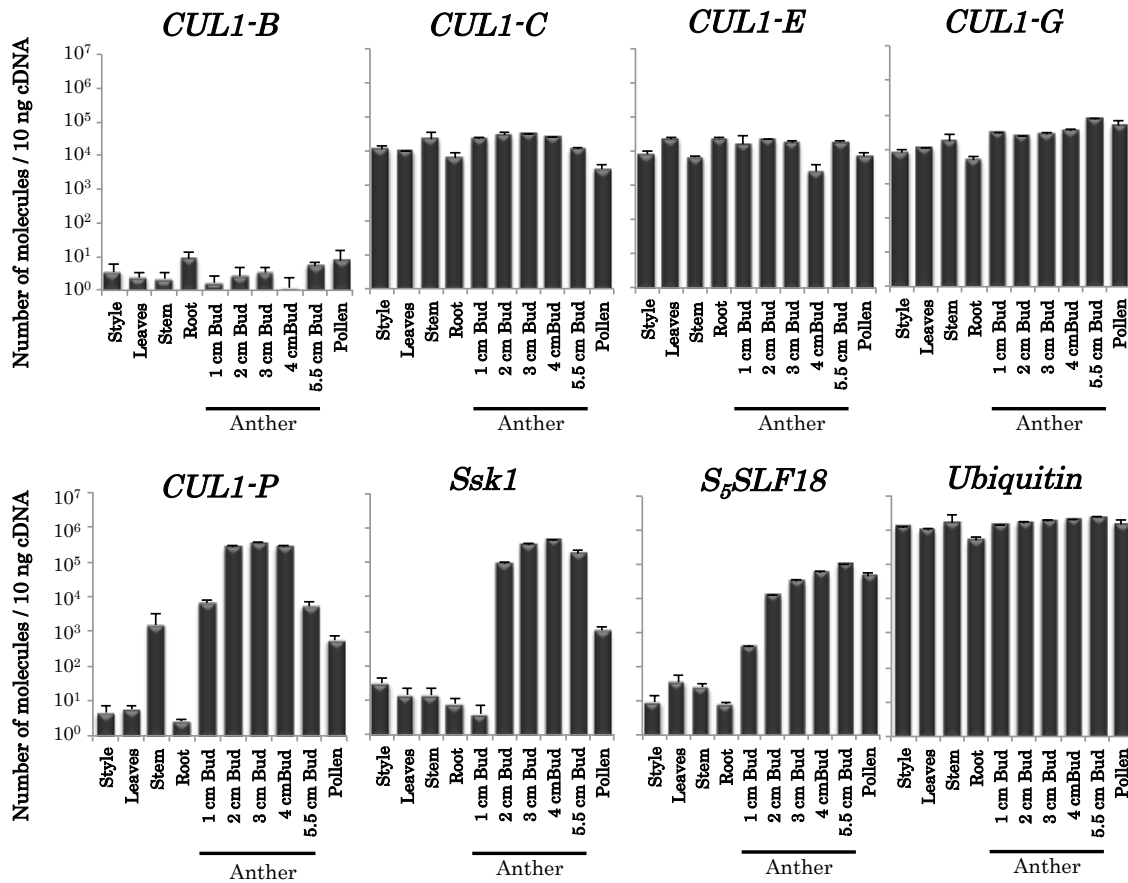
Fig. 1-2 *P. hybrida* の花粉および葯で発現する *CUL1s* の推定アミノ酸配列アライメント

網羅的トランスクリプトーム解析により同定された5つの *CUL1* 分子種 (P,B,C,G,E) の推定アミノ酸配列アライメントを示す。\*は Fig1-1 で同定された *CUL1-P* ペプチドフラグメント、下線は特異的抗 *CUL1-P*、-G 抗体作製に用いたペプチド配列を示す。



**Fig. 1-3** ナス科における *CUL1s* は系統学的に 4 種類に分類される

ベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ法による *CUL1* 遺伝子の推定アミノ酸配列の分子進化系統樹。それぞれの分岐上に示した数値は、1 を最大とした事後確率により信頼性を表す。各 *CUL1* 遺伝子については方法の章を参照。自家不和合性および種間不和合性に関与する *CUL1s* は、全て CUL1-P/B クレードに属している。



**Fig. 1-4** *CUL1s* のうち *CUL1-P* だけが、他の SCF<sup>SLF</sup> 構成因子とともに、雄性生殖器官特異的な発現プロファイルを示す

定量 PCR で、5 つの *CUL1s* および SCF<sup>SLFs</sup> 複合体構成分子の *SSK1* および *SLF* の器官別発現解析を行い、同時測定した標的遺伝子断片を含むプラスミドの段階希釈で得られた検量線 (10<sup>4</sup> fg、10<sup>3</sup> fg、10<sup>2</sup> fg、10<sup>1</sup> fg、10<sup>0</sup> fg、10<sup>-1</sup> fg、10<sup>-2</sup> fg) を元に各組織 10 ng cDNA 中に存在する転写物のコピー数を算出した。



## Dominant Negative

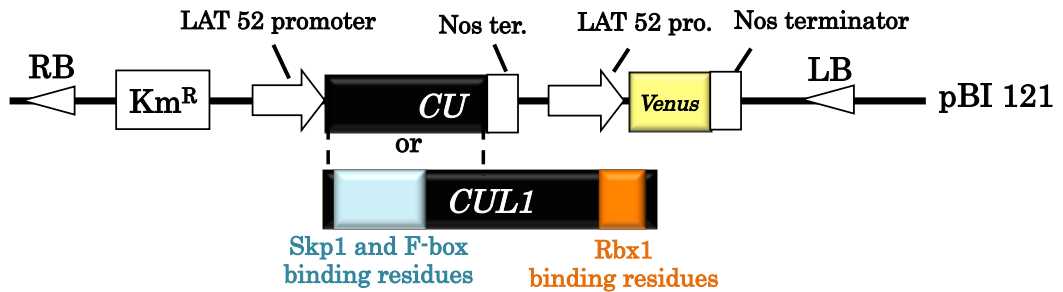


Fig. 1-5 機能欠失型 N 末端発現体用コンストラクトの概略図

葯および花粉特異的 *LAT52* プロモーターに、*CUL1*-P または -G の N 末端 422 アミノ酸のコード配列、および *Venus* 遺伝子をタンデムにつないだコンストラクトを作製した。

**Table 1-1.  $S_{11}S_{11} \times CUL1-P^{DN}$  交配に由来する次代への導入遺伝子の伝達率は分離歪みを示さない**

$T_0$ Transgenic in $S_5S_{17}$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Crossed to $S_{11}S_{11}$			
		Simple Mendelian segregation ratio ( $TG : WT$ )	Observed segregation ratio ( $TG : WT$ )	Chi square	$P$ -value
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-7</i>	50 (1)	1 : 1	17 : 12	0.862	0.353
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-13</i>	51.5 (1)	1 : 1	12 : 12	0	1
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-17</i>	50.2 (1)	1 : 1	7 : 20	0.626	0.012
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-5</i>	86.2 (3)	7 : 1	22 : 5	0.894	0.344
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-6</i>	87.8 (3)	7 : 1	20 : 4	0.381	0.537
<i>CUL1-P<sup>DN</sup>-12</i>	86.7 (3)	7 : 1	22 : 6	2.04	0.153

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Expected insertion loci”は、“% of  $T_0$  pollen venus”より推測した。

“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“ $P$ -value”は、“Chi square”より算出した。

**Table 1-2.  $S_{11}S_{11} \times CUL1-G^{DN}$  交配に由来する次代への導入遺伝子の伝達率は分離歪みを示さない**

$T_0$ Transgenic in $S_5S_{17}$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Crossed to $S_{11}S_{11}$			
		Simple Mendelian segregation ratio ( $TG : WT$ )	Observed segregation ratio ( $TG : WT$ )	Chi square	$P$ -value
<i>CUL1-G<sup>DN</sup>-3</i>	75.2 (2)	3 : 1	20 : 4	0.889	0.346
<i>CUL1-G<sup>DN</sup>-4</i>	50.6 (1)	1 : 1	13 : 11	0.167	0.683

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Expected insertion loci”は、“% of  $T_0$  pollen venus”より推測した。

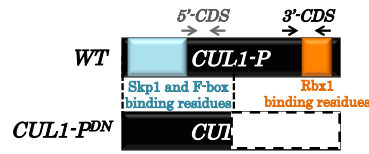
“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

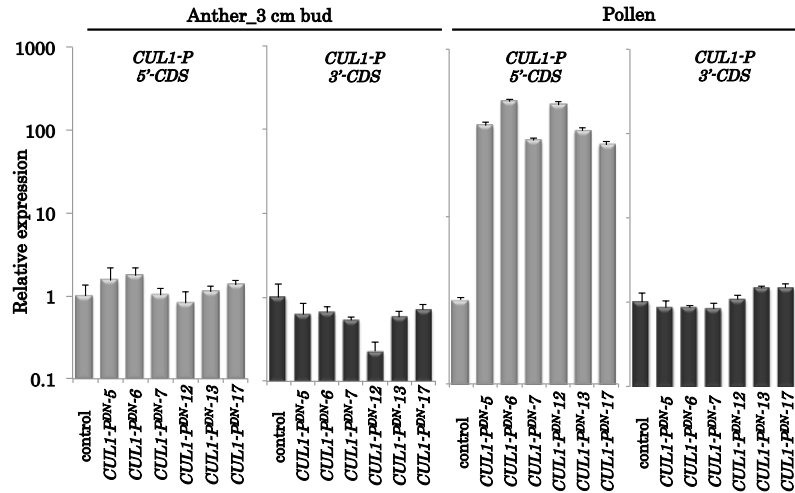
“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“ $P$ -value”は、“Chi square”より算出した。

A



B



C

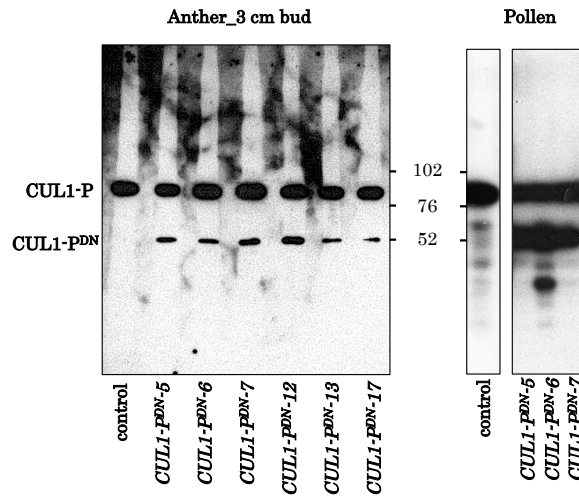


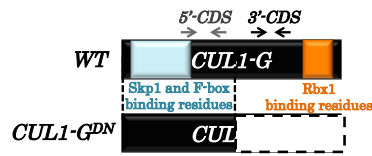
Fig. 1-6 機能欠失型  $CUL1-P^{DN}$  の転写、翻訳レベルでの発現

A. 定量 RT-PCR に用いたプライマー設計モデル図。矢印は定量 RT-PCR に用いた特異的プライマーを表す。

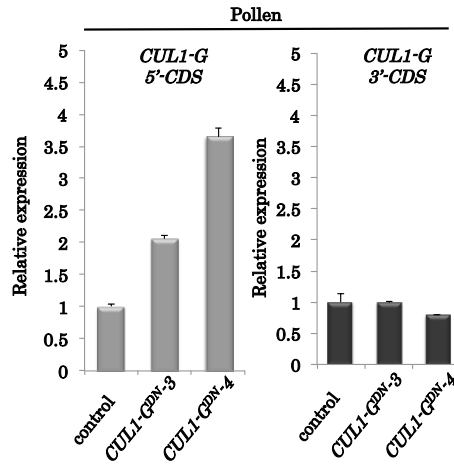
B. 定量 RT-PCR による葯 (左) および花粉 (右) における、導入  $CUL1-P^{DN}$  と内生  $CUL1-P$  の遺伝子発現の相対定量。親株での発現を 1 とし、内部標準には *Ubiquitin* を用いた。

C. 特異的抗  $CUL1-P$  抗体を用いた葯および花粉の  $CUL1-P$  発現ウェスタンブロット解析。各グラフの control は親株である非形質転換体を示す。

A



B



C

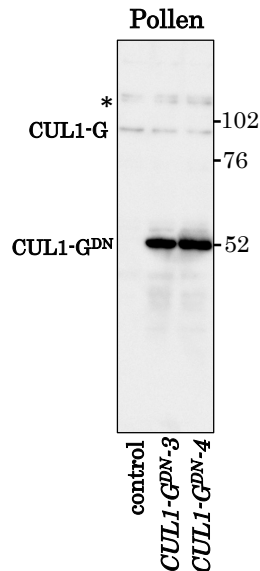
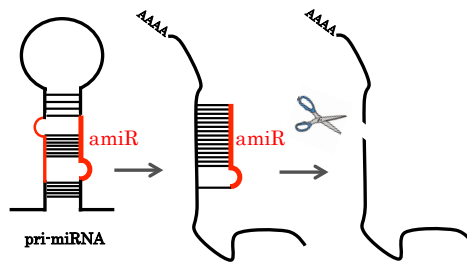


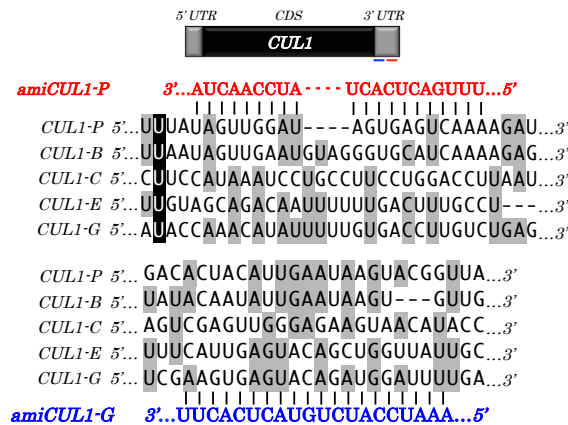
Fig. 1-7 機能欠失型  $CUL1-G^{DN}$  の転写、翻訳レベルでの発現

A. 定量 RT-PCR に用いたプライマー設計モデル図。矢印はプライマーを表す。  
 B. 定量 RT-PCR による葯（左）および花粉（右）における導入  $CUL1-G^{DN}$  と内生  $CUL1-G$  の遺伝子発現相対定量。親株発現を 1 とし、内部標準は *Ubiquitin* を用いた。  
 C. 特異的抗  $CUL1-G$  抗体を用いた葯および花粉の  $CUL1-G$  発現ウェスタンブロット解析。各グラフの control は親株である非形質転換体を示す。

A



B



C

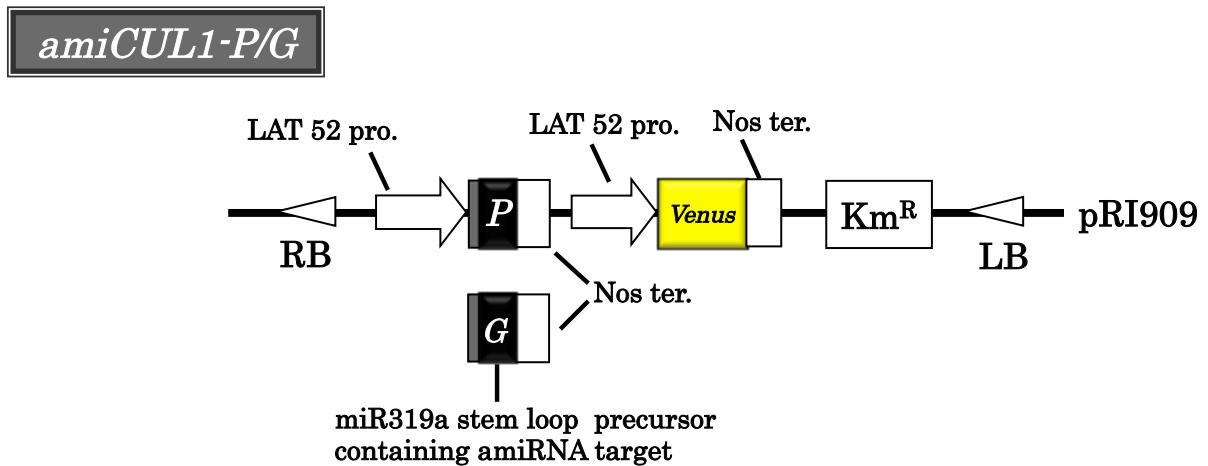


Fig. 1-8 amiRNA を用いた RNAi

A. *amiRNA* の RNAi 機構モデル図。赤太線は miRNA として機能する領域。  
B. 上 : *CUL1* 遺伝子の模式図。 *amiCUL1-P*、 *-G* の 3'-UTR 標的配列位置を下線で示す。下 : *amiCUL1-P*、 *-G* 配列と 5 つの *CUL1* 遺伝子の標的配列の間の DNA 配列アライメント。相補的な塩基について縦線で示す。C. *amiCUL1-P*、 *-G* コンストラクトの模式図。

**Table 1-3.  $S_{II}S_{II} \times amiCUL1-P$  交配に由来する次代への導入遺伝子伝達率は分離歪みを示し、形質転換花粉の稔性低下を示唆する**

Crossed to $S_{II}S_{II}$					
$T_0$ Transgenic in $S_mS_m$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Simple Mendelian segregation ratio ( $TG : WT$ )	Observed segregation ratio ( $TG : WT$ )	Chi square	$P$ -value
<i>amiCUL1-P-M1</i>	85 (3)	7 : 1	16 : 35	146.894	8.279E-34
<i>amiCUL1-P-M2</i>	75 (2)	3 : 1	23 : 51	76.126	2.661E-18
<i>amiCUL1-P-M3</i>	50 (1)	1 : 1	13 : 48	20.082	7.419E-06
<i>amiCUL1-P-M7</i>	50 (1)	1 : 1	35 : 77	15.75	7.229E-05

Crossed to $S_{II}S_{II}$					
$T_0$ Transgenic in $S_5S_{17}$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Simple Mendelian segregation ratio ( $TG : WT$ )	Observed segregation ratio ( $TG : WT$ )	Chi square	$P$ -value
<i>amiCUL1-P-B1</i>	51 (1)	1 : 1	52 : 109	20.180	7.048E-06
<i>amiCUL1-P-B6</i>	50 (1)	1 : 1	101 : 169	17.126	3.498E-05
<i>amiCUL1-P-B7</i>	50 (1)	1 : 1	39 : 57	7.521	6.099E-03

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Expected insertion loci”は、“% of  $T_0$  pollen venus”より推測した。

“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“ $P$ -value”は、“Chi square”より算出した。

**Table 1-4.  $S_{0m}S_{0m} \times amiCUL1-P$  交配に由来する次代への導入遺伝子伝達率は分離歪みを示さない**

$T_0$ Transgenic in $S_mS_m$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Crossed to $S_{0m}S_{0m}$			
		Simple Mendelian segregation ratio (TG : WT)	Observed segregation ratio (TG : WT)	Chi square	P-value
<i>amiCUL1-P-M1</i>	85 (3)	7 : 1	36 : 4	0.229	0.633
<i>amiCUL1-P-M2</i>	75 (2)	3 : 1	49 : 21	0.933	0.334
<i>amiCUL1-P-M3</i>	50 (1)	1 : 1	17 : 13	0.533	0.465
<i>amiCUL1-P-M7</i>	50 (1)	1 : 1	19 : 25	0.818	0.366

$T_0$ Transgenic in $S_5S_{17}$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Crossed to $S_{0m}S_{0m}$			
		Simple Mendelian segregation ratio (TG : WT)	Observed segregation ratio (TG : WT)	Chi square	P-value
<i>amiCUL1-P-B1</i>	51 (1)	1 : 1	15 : 15	0	1
<i>amiCUL1-P-B6</i>	50 (1)	1 : 1	16 : 14	0.133	0.715
<i>amiCUL1-P-B7</i>	50 (1)	1 : 1	16 : 8	2.667	0.102

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Expected insertion loci”は、“% of  $T_0$  pollen venus”より推測した。

“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“P-value”は、“Chi square”より算出した。



**Table 1-5.**  $S_{17}S_{17}$ 、 $S_{19}S_{19} \times amiCUL1-P-M3$  交配に由来する次代への導入遺伝子伝達率は分離歪みを示し、形質転換花粉の SI 特異的稔性低下を示唆する

Crossed with $S_m S_m T_0 amiCUL1-P-M3$	Simple Mendelian segregation ratio (TG : WT)	Observed segregation ratio (TG : WT)	Chi square	P-value
$S_{0m} S_{0m}$ (SC)	1 : 1	17 : 13	0.533	0.465
$S_{11} S_{11}$ (SI)	1 : 1	13 : 48	20.082	7.419E-06
$S_{17} S_{17}$ (SI)	1 : 1	1 : 31	28.125	1.137E-07
$S_{19} S_{19}$ (SI)	1 : 1	2 : 33	27.457	1.606E-07

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“P-value”は、“Chi square”より算出した。

**Table 1-6.  $S_{11}S_{11} \times amiCUL1-G$  交配に由来する次代への導入遺伝子伝達率は分離歪みを示さない**

$T_0$ Transgenic in $S_5S_{17}$	% of $T_0$ pollen venus (Expected insertion loci)	Crossed to $S_{11}S_{11}$			
		Simple Mendelian segregation ratio ( $TG : WT$ )	Observed segregation ratio ( $TG : WT$ )	Chi square	$P$ -value
<i>amiCUL1-G-B8</i>	72.6 (2)	3 : 1	21 : 9	0.400	0.527
<i>amiCUL1-G-B10</i>	49.8 (1)	1 : 1	17 : 14	0.290	0.590
<i>amiCUL1-G-B13</i>	47.6 (1)	1 : 1	15 : 14	0.034	0.853
<i>amiCUL1-G-B18</i>	48.5 (1)	1 : 1	16 : 17	0.030	0.862
<i>amiCUL1-G-B19</i>	48.2 (1)	1 : 1	18 : 17	0.029	0.866

“% of  $T_0$  pollen venus”は、形質転換遺伝子と同時に導入した花粉発現 venus 蛍光をもつ花粉の割合を蛍光顕微鏡観察により算出した。

“Expected insertion loci”は、“% of  $T_0$  pollen venus”より推測した。

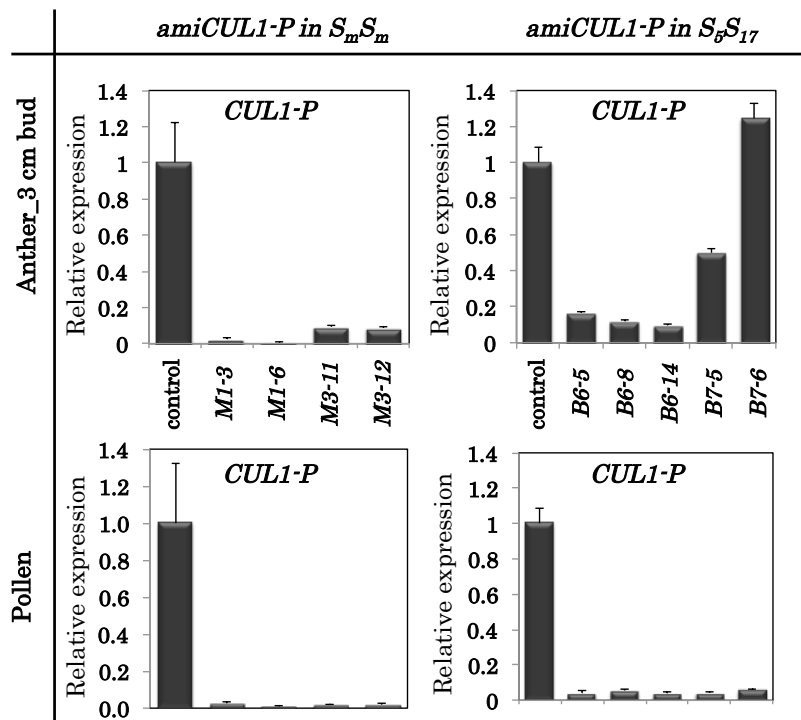
“Simple Mendelian segregation ratio”は、メンデル遺伝の法則に従い次世代へ伝達された場合の分離比を示した。

“Observed segregation ratio”は、得られた個体を試料として、導入遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR ジェノタイピングにより決定した。

“Chi square”は、“Simple Mendelian segregation ratio”に対する“Observed segregation ratio”より算出した。

“ $P$ -value”は、“Chi square”より算出した。

A



B

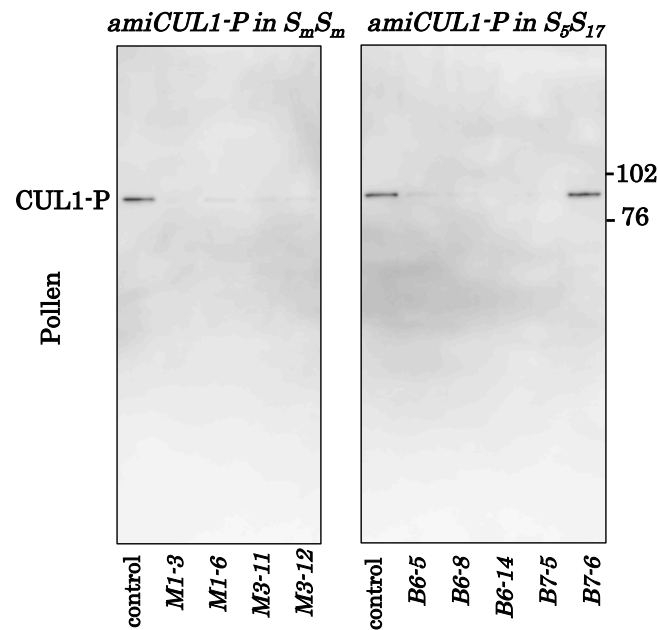
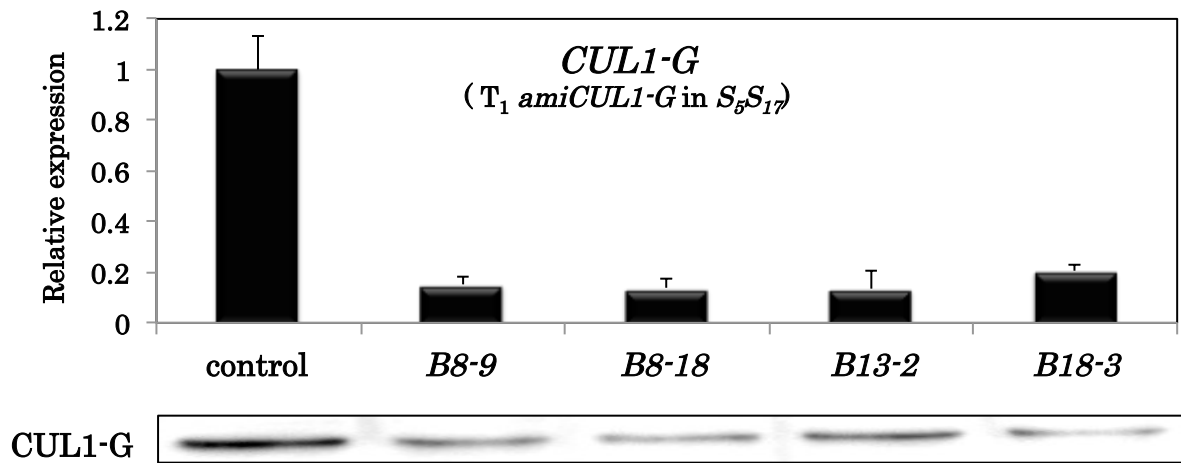


Fig. 1-9 *amiCUL1-P* 形質転換体では、*CUL1-P* の発現が抑制された

A. 定量 RT-PCR による T<sub>1</sub> *amiCUL1-P* の *CUL1-P* 遺伝子発現相対定量。親株発現を 1 とし、内部標準は *Ubiquitin* を用いた。上：葯、下：花粉。

B. 花粉を試料とした特異的抗 *CUL1-P* 抗体によるウェスタンブロット。各 control は親株である非形質転換体を示す。



**Fig. 1-10** *amiCUL1-G* 形質転換体では、*CUL1-G* の発現抑制は弱い

A. 上：定量 RT-PCR による  $T_1$  *amiCUL1-G* の *CUL1-G* 遺伝子発現相対定量。親株発現を 1 とし、内部標準は *Ubiquitin* を用いた。下：特異的抗 *CUL1-G* 抗体によるウェスタンブロット解析。各 control は親株である非形質転換体を示す。



**Fig. 1-11 *amiCUL1-P* ホモ個体の花粉は、 $S_9S_9$ 、 $S_{11}S_{11}$ 、 $S_{17}S_{17}$ 、 $S_{19}S_{19}$  雌ずいにおいて花粉管伸長の抑制を示す**

A.  $S_9S_9$  雌ずい、48 時間後。B.  $S_{11}S_{11}$  雌ずい、24 時間後。C.  $S_{17}S_{17}$  雌ずい、24 時間後。D.  $S_{19}S_{19}$  雌ずい、24 時間後。(A-D) 上：花粉管伸長アニリンブルー観察像。左より和合受粉の親株花粉  $S_mS_m$  受粉、不和合受粉、T<sub>1</sub> 花粉 *amiCUL1-P-M1-3*、*amiCUL1-P-M3-11* を受粉した。下：各花粉管伸長の平均。検定は  $S_mS_m$  を受粉した和合受粉に対して行った。\*P<0.05、\*\*P<0.01。

A

B

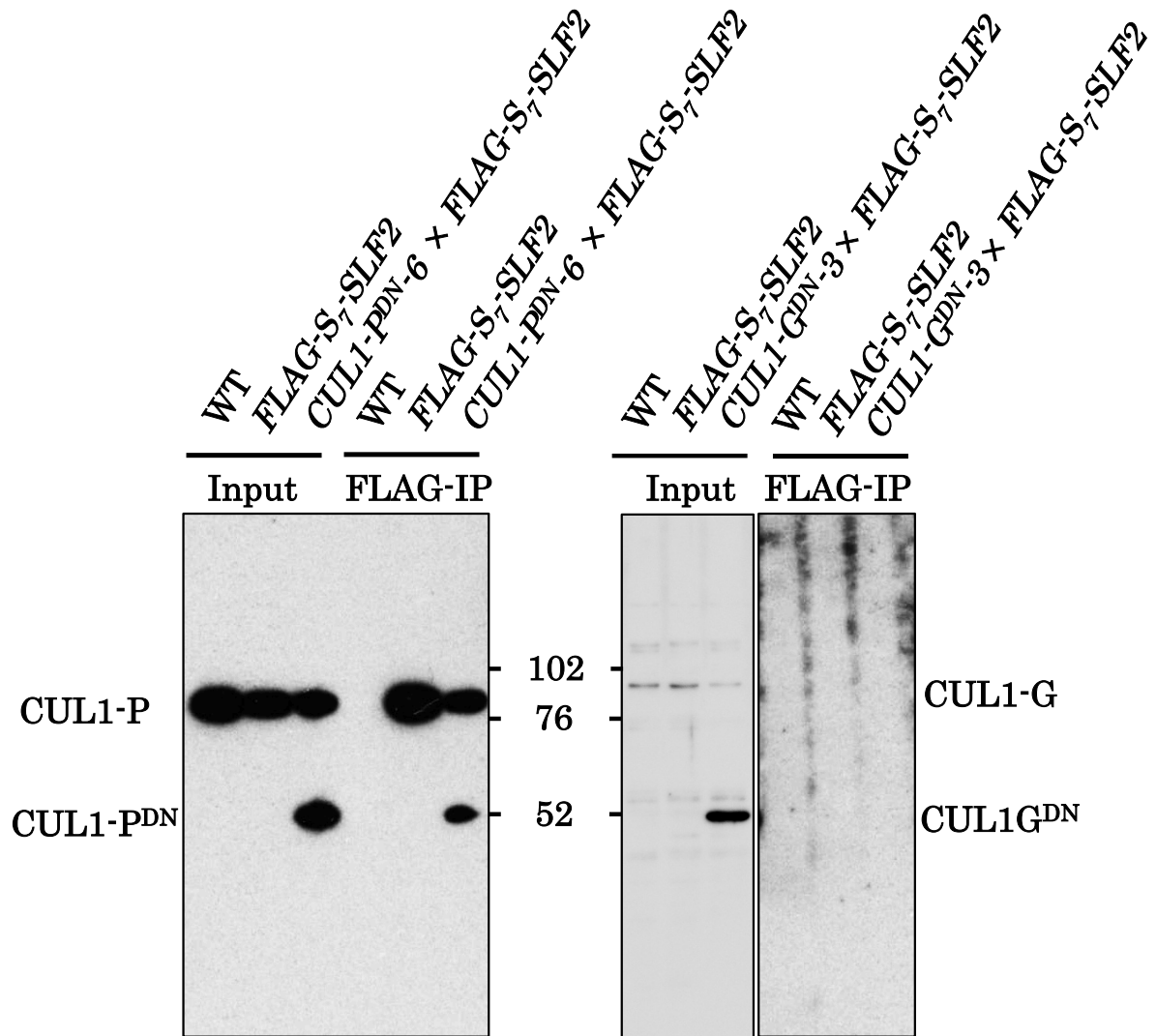
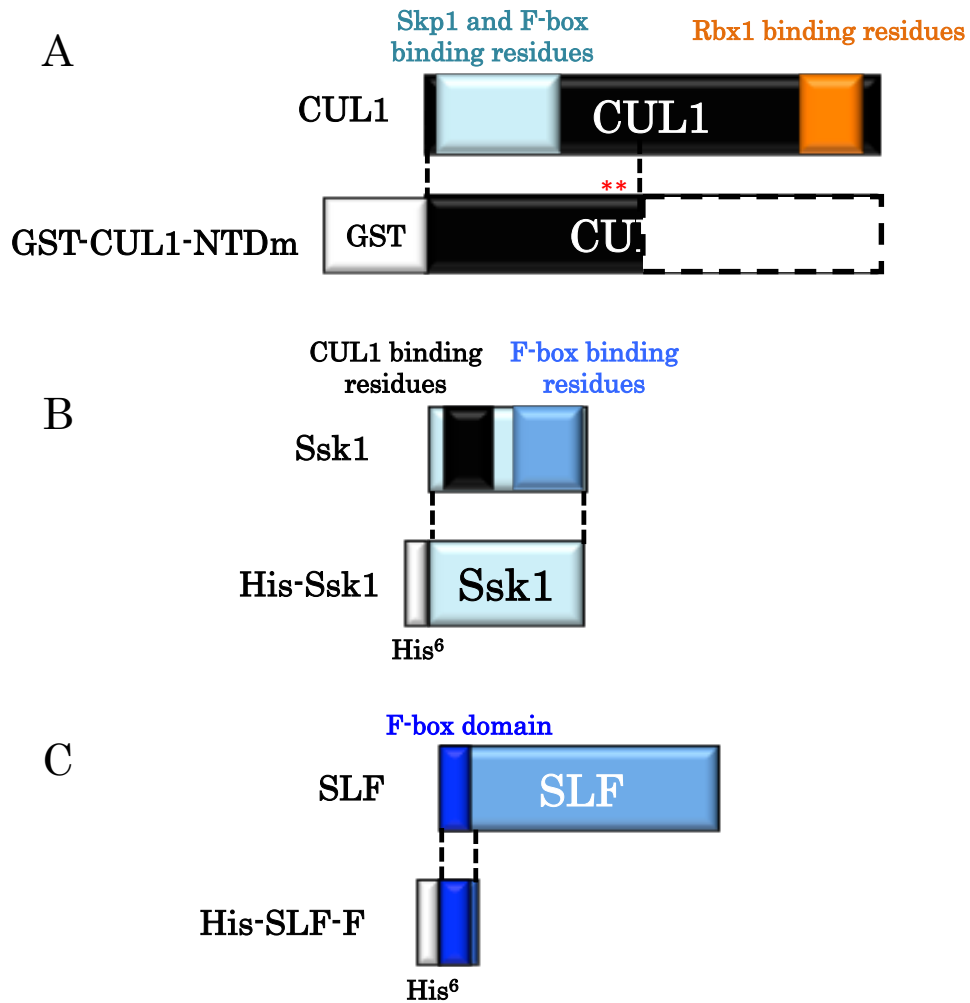


Fig. 1-12 SLF と CUL1-P は *in vivo* で複合体を形成している

A. 抗 CUL1-P 抗体によるウェスタンブロット解析。

B. 抗 CUL1-G 抗体によるウェスタンブロット解析。



**Fig. 1-13** リコンビナントタンパク質コンストラクトの模式図

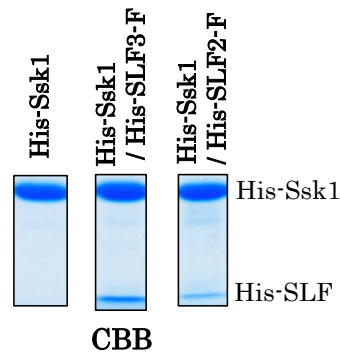
A. GST 融合 CUL1N 末端部位発現コンストラクト。\*は、可溶化のための変異導入個所を示す。

B. His-SSK1 発現コンストラクト。

C. His-SLF-F 発現コンストラクト。



A



B

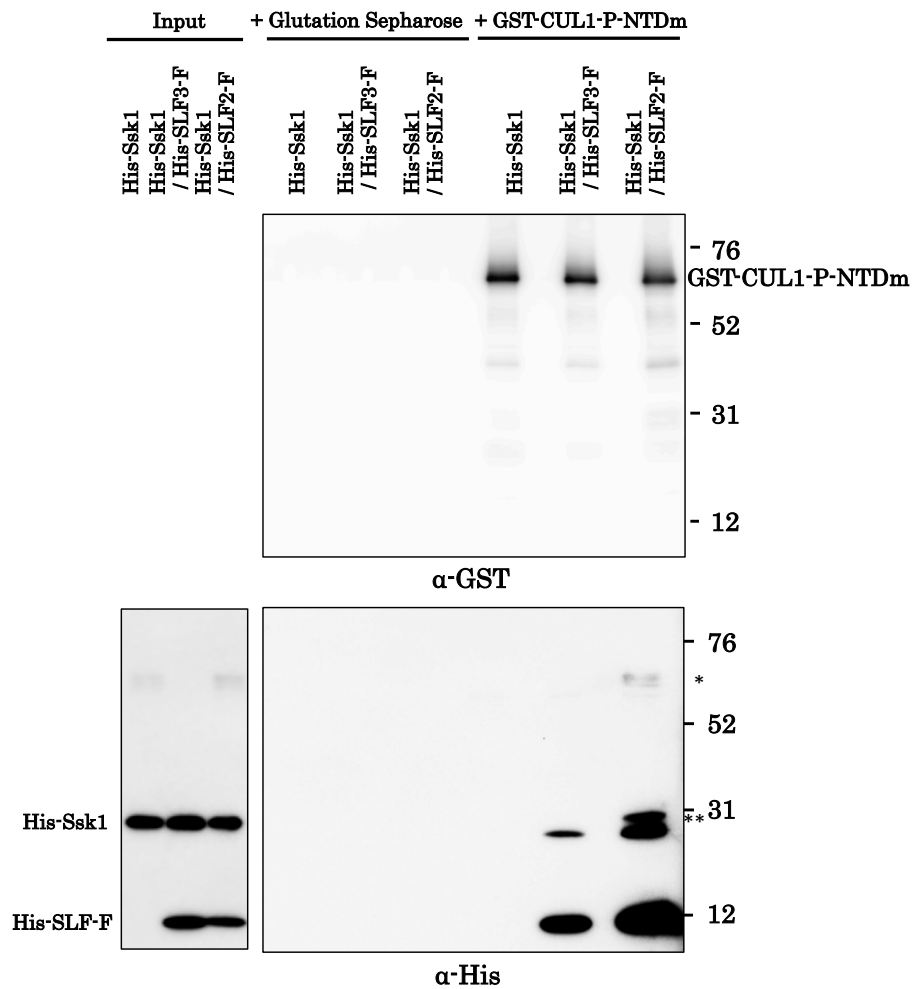
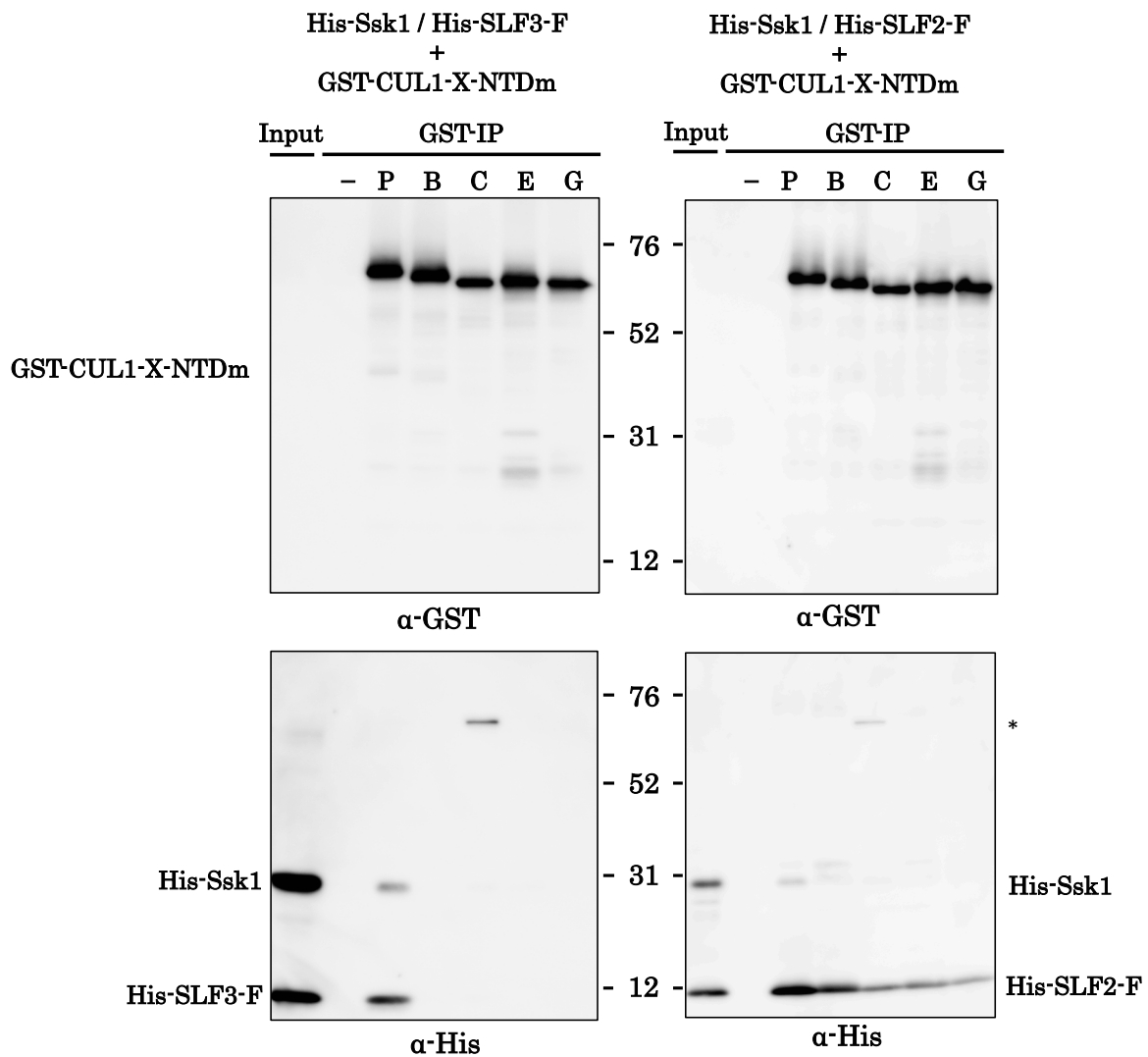


Fig. 1-14 CUL1-P は SSK よりも SSK-SLF 複合体と選択的に結合する

A. CBB 染色によるタンパク質発現量。His-SSK1、His-SSK1/His-SLF3-F、His-SSK1/His-SLF2-F を His タグ精製した。上：His-SSk1、下：His-SLF。B. 抗 GST および His 抗体によるウェスタンブロット。\*および\*\*は、非特異的な検出を示す。

A

B



**Fig. 1-15** ナス科 CUL1s の SSK-SLF 複合体との親和性の比較

A. GST-CUL1-X-NTDm と His-SSK1/His-SLF3-F の GST 共免疫沈降。上に抗 GST 抗体、下に抗 His 抗体によるウェスタンブロット解析を示す。

B. GST-CUL1-X-NTDm と His-SSK1/His-SLF2-F の GST 共免疫沈降。上に抗 GST 抗体、下に抗 His 抗体によるウェスタンブロット解析を示す。\*は非特異的な検出を示す。

## 第2章 和合受粉時における S-RNase 無毒化機構の解明

## 2-1 序

第1章で筆者が行った実験結果から、SLFはCUL1-Pと典型的なSCF複合体を形成し、非自己S-RNaseの無毒化を担っていると考えられる。当研究室において花粉から精製したSCF<sup>SLF</sup>複合体によるS-RNaseの*in vitro*ユビキチン化は確認されているが (Entani *et al.*, 2014)、ユビキチン化されたS-RNaseがどのように無毒化されているかは不明である。序論では、非自己S-RNaseの無毒化機構にユビキチン化タンパク質の一般的な運命である26Sプロテアソームによる分解モデルと液胞に隔離される隔離モデルが提唱されていることを述べた。ユビキチン-プロテアソーム系による分解モデルはS-RNaseの無毒化機構として理にかなっているが、ユビキチンのそれ以外の機能として、タンパク質間相互作用、タンパク質の活性、タンパク質の局在を調節することが知られており (Komander and Rape, 2012)、分解以外の運命についても留意する必要がある。

花柱の通導組織細胞外マトリクスには大量のS-RNaseが蓄積しており、その中を伸長する花粉管に侵入したわずかなS-RNaseのみを取り出して解析することは困難である。従って、これまでは組織を固定化した後、花粉管の中に局在するS-RNaseを観察することによって、S-RNaseの無毒化機構を推定するアプローチがとられてきた。Cappadociaらのグループは、抗S-RNase抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により、不和合および和合受粉いずれの花粉管でもS-RNaseは細胞質に局在し、存在するS-RNaseの量は和合、不和合間で差がないと報告した (Luu *et al.*, 2000)。一方、隔離説を主張するMcClureらのグループは、光学顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法により、受粉初期の花粉管では和合、不和合花粉両者とも液胞にS-RNaseが隔離されており、後期には不和合花粉でのみS-RNaseが細胞質に観察されると報告した (Goldraj *et al.*, 2006)。材料や手法は異なるものの両者の結果は全く相反するものである。また、このMcClureらの報告は分解モデルとは合致せず、Cappadociaらの報告は、分解モデル、隔離モデルいずれとも合致しない結果である。

そこで本章では、花柱を伸長中の花粉管におけるS-RNaseの局在を精確に観察することにより、S-RNase無毒化機構解明の手がかりが得られるのではないかと考え、花粉管内におけるS-RNaseの分布を抗S-RNase抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により詳細に解析した。

## 2-2 材料及び方法

### アニリンブルー染色における花粉管伸長の観察

開葯直前に除雄した  $S_9S_9$  個体の雌ずいに、 $S_9S_9$  個体の自家花粉あるいは  $S_7S_7$  個体の他家花粉を受粉させた。受粉後 4~8 時間後に雌ずい回収し、酢酸-エタノール溶液（酢酸:エタノール=1:3）に浸し、脱気後、室温で一晩放置することにより固定した。1N NaOH 溶液に入れ替え、65°C で 8 時間浸し、花柱組織を柔軟化した。0.01% アニリンブルー溶液（2%  $K_3PO_4$ 、0.01% アニリンブルー）に入れ替え、室温、暗所、一晩静置して染色した。50%グリセロールを用いてスライドガラス上にマウントし、カバーガラスを被せ、花柱を軽く押し潰した。蛍光顕微鏡（Zeiss）で 395 nm 励起光下（蛍光フィルター：420 nm）で花柱内の花粉管カロースを蛍光観察し、CCD カメラ（AxioCam MRc5、Zeiss）で撮影した。

### 抗 $S_9$ -SRNase 抗体の作製

$S_9$ -SRNase の C 末端 10 アミノ酸部分の N 末端にシステイン残基を付加した 11 アミノ酸ペプチド（CEKTRKILFRG）を化学合成し（サワディー・テクノロジー）、MBS 法により KLH にコンジュゲートしたものを抗原としてウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た（スカ・フラット）。得られた抗血清より硫酸沈殿法により IgG 画分（20~40%硫酸沈殿画分）を濃縮回収し、上記ペプチドを固定化させたカラム（SulfoLink column, Pierce）により、抗  $S_9$ -RNase 抗体をアフィニティー精製した。

### 免疫電顕試料作製

開葯直前に除雄した  $S_9S_9$  個体の雌ずいに、 $S_9S_9$  個体の花粉あるいは  $S_7S_7$  個体の花粉を受粉させた。受粉 6 時間後の雌ずいを回収し、固定液（4% paraformaldehyde、0.7% glutaraldehyde、5 mM リン酸バッファー、pH7.2）内で切断、脱気し、4°C で 2 時間静置し、固定した。氷冷した 5 mM リン酸バッファーで 10 分間、5 回洗浄し、再度溶液を添加して 4°C で一晩静置して固定液を完全に除去した。次に試料を 4°C、25%エタノール中で、30 分間静置し、その後 -30°C で、60%、80%と段階的にエタノール濃度をあげて各々 2 時間静置し、

99%エタノール中で一晩静置した。試料を室温に戻し、100% エタノールで 10 分間、3 回静置した。100%エタノールとプロピレンオキサイドを 2:1、1:2 の比率で混合した溶液を用意し、それぞれ室温で 10 分間浸漬し、プロピレンオキサイドを組織に浸透させた後、100%プロピレンオキサイドに室温、30 分間、2 回浸漬した。プロピレンオキサイドと LR White 樹脂 (London Resin Co., London) を 3:1、1:1、1:3 の比率で混合した液を用意し、それぞれ暗所、2 時間毎に交換し、LR-White 樹脂を組織に浸漬させた。100% LR-White 樹脂に交換、2 時間浸漬を 2 回繰り返した後、再度溶液を交換し、一晩浸漬させた。100% LR-White 樹脂を注いだゼラチンカプセル (EM ジャパン) に雌ずいを一つずつ入れ、紫外線重合装置 (DSK) にて、48 時間紫外線を照射して包埋した。

包埋した試料は、ウルトラミクロトーム (Leica) に設置した準薄切片用ダイヤモンドナイフ (日新 EM) で 1  $\mu\text{m}$  厚準薄切片を切り進め、花粉管が見えた位置より、超薄切片用ダイヤモンドナイフ Nanotome (酒井電子顕微鏡応用研究所) を用いて 100 nm 厚の超薄切片を 20 枚作製、0.5%フォルムバル溶液を支持膜として貼った Gilder Fine Bars Square Mesh\_G200HS (Gilder) に乗せた。準薄切片用ナイフに交換し、1  $\mu\text{m}$  厚で 98  $\mu\text{m}$  分切り進めた後、超薄切片用ナイフで 100 nm 厚の超薄切片 20 枚を採取することを繰り返し、連続切片を作製した。

試料を、ブロッッキング溶液[5%ウシアルブミン、10%ヤギアルブミン、1 $\times$ Super Block PBS(Thermo)]で室温、90 分間放置し、一次抗体は、1%ウシアルブミンを PBS-T[0.05% tween20、PBS(日水製薬)]で任意希釈し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。使用した抗体と希釈率は、上記抗 S<sub>9</sub>-RNase 抗体 (1/100 希釈)、抗カロース抗体 (monoclonal antibody  $\beta$ 1,3-gulucan mouse IgG, Biosplines, 1/500 希釈) である。PBS-T で室温 3 分間、3 回洗浄し、PBS-T で各々 1/75 希釈した 2 種類の二次抗体の混合溶液中で、室温で 90 分間反応させた。用いた二次抗体は、15 nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体[Anti-IgG(H+L), Goat, Rabbit-Poly, Gold 15 nm, BBI Solutions]と、5 nm 金コロイド標識抗マウス IgG 抗体 [Anti-IgG(H+L), Goat, Mouse-Poly, Gold 5 nm, BBI Solutions]である。PBS-T で室温 3 分間、3 回洗浄し、H<sub>2</sub>O で室温 1 分間、2 回洗浄し、さらに流水で 10 秒間洗浄後、試料をろ紙の上で乾燥した。2% Uran 水溶液中に試料を 3 分間浸して染色し、流水で 10 秒間洗浄してろ紙上で乾燥した。免疫染色を行った切片は、透過型電子顕微鏡 (H-7100, 日立) を用いて観察し、CCD カメラ (AMT XR-41) で撮影した。

## 免疫染色試料の解析

花粉管内 S-RNase 濃度の算出を、ImageJ 1.440 (Schneider *et al.*, 2012) を用いて行った。抗カロース抗体のシグナルで囲まれた花粉管内面積を計測し、 $1\ \mu\text{m}^2$  当りの中での S<sub>9</sub>-RNase に由来する 15 nm 金粒子の密度を算出した。それを、同一切片内 3 カ所の  $1\ \mu\text{m}^2$  細胞外マトリクスにおける金粒子平均密度を 1 とした時の相対値として算出した。

## 2-3 結果

### 免疫電子顕微鏡観察による S-RNase 定量法の検討

S-RNase 無毒化機構が分解モデルに従うのであれば和合花粉の細胞質内の S-RNase 濃度が不和合花粉と比較して減少していることが期待される。一方、隔離モデルに従うのであれば、和合および不和合花粉管内で、S-RNase の局在に差異があることが期待される。そこで、最も分解能の高い免疫電子顕微鏡観察法を用い、花柱を伸長中の花粉管内 S-RNase の局在を定量的に観察することを計画した。なお、これまでに他グループから報告されている S-RNase 局在の観察結果が相反するものであったことから (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006)、和合・不和合受粉の違いを観察する時期、花柱を伸長中の花粉管の観察位置、用いる抗体の特異性など観察条件を慎重に検討する必要があると考えた。そこで、本研究では S-RNase の局在を正確に定量化するため、次のような条件検討を行った。

#### 1. 花柱を伸長する花粉管の観察時期の検討

先の報告では、受粉後 16~36 時間の組織を用いて観察を行っていたが、不和合受粉では花粉管の伸長停止に加え、アクチンの崩壊やミトコンドリアの膨張など細胞死に関連する現象も観察されているため (Wang *et al.*, 2009)、観察された S-RNase の分布や濃度の変化が不和合反応の原因か結果かの判断は注意を要する。細胞死等に伴う 2 次的な効果を観察することを避けるために、和合受粉と不和合受粉の花粉管伸長に差が現れ始める直後を観察時期として選択することにした。その段階では、S-RNase の濃度や分布に和合花粉と不和合花粉で差異が認められるはずである。そこで、まず  $S_9S_9$  個体の雌ずいに  $S_9S_9$  および  $S_7S_7$  個体の花粉を受粉して、4、6、8 時間後の花粉管伸長をアニリンブルー染色により観察し、和合と不和合花粉で伸長差が起こる時間帯を調べた。その結果、受粉後 4 時間では和合と不和合花粉で花粉の伸長に明確な差は観察されなかったが、受粉後 6 時間では不和合花粉の伸長が遅れていたため、受粉後 6 時間をサンプルの採取時期として選択した (Fig. 2-1)。

#### 2. サンプルの観察部位の検討



これまでの報告は花粉管の観察部位における詳細な記述がないことから、花粉管のどの位置を観察しているかは不明である。花粉管の伸長は花粉毎に大きく異なるため、おそらく観察切片中を伸長中の花粉管の様々な部位をランダムに観察していたと思われる。伸長中の花粉管は、その位置により細胞内オルガネラが異なる事が知られている (Fig. 2-2) (Qin *et al.*, 2011)。伸長先端は、カロース壁が薄く、ベシクル様の構造をもつものが多数存在する。柱頭側へいくにつれて、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内オルガネラが出現し、その後核、そして巨大な液胞が現れることがわかっている。S-RNase がどのように花粉管内に侵入するのかは不明であり、もし特定の場所から侵入していたり、侵入後どこかに隔離されている場合、同じ花粉管でも観察位置によって S-RNase の量が異なる結果になると予想される。そこで、花柱の連続した横断切片を作製して、同一花粉管における S-RNase の分布を先端からトラッキングしていくことにした。個々の花粉管を連続して観察できる間隔を検討したところ、100  $\mu\text{m}$  間隔で切片を作製することにより、個々の花粉管の特定が可能であることが明らかとなった (Fig. 2-3)。そのため、花粉管が初めて出現した切片を花粉管先端から 0~100  $\mu\text{m}$  の位置とし、以降 100  $\mu\text{m}$  間隔で花粉管の根元に向かって S-RNase の観察を行うことにした。

### 3. S-RNase 検出条件の検討

細胞の形態から花柱通導組織細胞と花粉管細胞の区別はある程度可能であるが、観察した細胞が花粉管であることを確認するために、抗カロース抗体を用いることにした。カロースは $\beta$ -1,3-gulcan のポリマーであり、花粉管の細胞壁に豊富に存在するが、花柱通導組織細胞の細胞壁にはほとんど存在しないことから、抗カロース抗体を用いることにより、花柱中の花粉管を区別することが可能である (Meikle *et al.*, 1991)。また、S<sub>9</sub>-RNase の検出に用いる抗体は S<sub>9</sub>-RNase に特異的な C 末端配列を認識するペプチド抗体 (Kubo *et al.*, 2010) を用いることにした。この抗 S<sub>9</sub>-RNase 抗体は、S<sub>9</sub>-RNase のみを特異的に検出することが花柱抽出物を用いたウエスタンブロット解析により確認されているが、免疫電子顕微鏡観察においても交差反応のない条件で観察できるよう、S<sub>9</sub>S<sub>9</sub> および S<sub>5</sub>S<sub>5</sub> 個体の花柱を用いて、免疫反応の条件検討を行った。その結果、抗カロース抗体は両花柱で反応するが、抗 S<sub>9</sub>-RNase 抗体は S<sub>9</sub>S<sub>9</sub> の花柱にのみ反応する条件を確立することができたため (Fig. 2-4)、以降この条件で花粉管内における S<sub>9</sub>-RNase を観察することにした。

## 和合、不和合受粉時の花柱および花粉管先端における S<sub>9</sub>-RNase の定量

上記条件検討結果をもとに、S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>あるいは S<sub>7</sub>S<sub>7</sub>個体の花粉を不和合あるいは和合受粉させた S<sub>9</sub>S<sub>9</sub>個体の雌ずいを、受粉 6 時間後に回収・固定し、100 μm 毎の位置で薄切片を複数作製し ( $n = 3 \sim 15$ )、S<sub>9</sub>-RNase の定量を行った。

まず、花粉管が通っていない通導組織細胞外マトリクスに検出される S<sub>9</sub>-RNase の定量を行った。一本目の花粉管先端が検出された位置から 500 μm の位置まで計測したところ、S<sub>9</sub>-RNase 量を示す金粒子の数は、15~30 個/μm<sup>2</sup> とおおむね揃った値となった (Fig. 2-5)。この結果は、受粉 6 時間後の花柱の通導組織における S<sub>9</sub>-RNase 量は、和合・不和合受粉に関わらず、ほぼ一定に保たれていることを示唆した。一方、同一箇所で作製した切片間でも金粒子の数に比較的大きなばらつきが認められる原因は、免疫反応操作のぶれなど人為的要因が大きいと考えられた。そこで、以下の花粉管内の S<sub>9</sub>-RNase の定量においては、切片間のばらつきを補正するために、通導組織細胞外マトリクスの S<sub>9</sub>-RNase 密度を 1 とした時の相対値で表記することとした。

次に、和合受粉させた花柱切片の中から 7 本、不和合受粉させた花柱切片の中から 3 本の花粉管を選択し、各々の先端から 0~500 μm の位置において S<sub>9</sub>-RNase の密度を計測した (Fig. 2-6, 7)。なお、花粉管先端 0~100 μm の部位における電子顕微鏡像では、いずれも分泌小胞様の構造が多数確認でき、一方、細胞内オルガネラはほとんど観察されなかった (Fig. 2-6)。また、抗カロース抗体の反応する細胞壁層が薄いことも確認され、確かに花粉管の先端を観察できているものと判断した (Fig. 2-6)。抗カロース抗体のシグナルで囲まれた花粉管内に局在する S<sub>9</sub>-RNase に由来する金粒子の密度を細胞外マトリクスにおける金粒子密度を 1 とした時の相対値で表すと、不和合花粉では 0.12 であり、和合花粉の 0.02 よりも 5 倍程度高いことが判明した (Fig. 2-7)。また、観察された S<sub>9</sub>-RNase のすべては細胞質と思われる場所に検出され、花粉管内に侵入した S<sub>9</sub>-RNase が、受粉後 6 時間の段階ですでに不和合花粉管の細胞質に蓄積していることが明らかになった。

花粉管先端から 100~500 μm の位置の花粉管の電子顕微鏡像は厚いカロース層をもち、その内側にはゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア、液胞などの細胞内オルガネラが多数観察された (Fig. 2-6)。S<sub>9</sub>-RNase の定量化を行ったところ、花粉管の先端から 100~400 μm の領域において、不和合花粉管に S<sub>9</sub>-RNase の蓄

積が観察された (Fig. 2-7)。不和合花粉管の S<sub>9</sub>-RNase の分子数は先端が最も多く、先端から離れるにつれて少なくなっていく、500 μm の領域では和合花粉管と区別がつかなくなった。また、これらの領域においても先端部と同様に、S<sub>9</sub>-RNase のほとんどが細胞質に局在しており、液胞等の小胞には検出されなかった。おそらく、S-RNase は花粉管の先端部より細胞質に侵入した後に内部を拡散していき、和合花粉ではこの花粉管先端部において細胞質から分解除去されているものと推察された。花粉管の核は先端から 500~1,000 μm の位置に現れ、同時に巨大な液胞も観察され始めたが、和合、不和合花粉管いずれの場合もこれらの細胞内器官には S<sub>9</sub>-RNase 分子はほとんど検出されなかった。

### S-RNase の細胞内局在

上記の実験で、受粉後 6 時間の和合花粉管の先端では、不和合受粉の場合と比較して、細胞質内の S<sub>9</sub>-RNase が有意に減少していることが明らかとなった。これまでの観察から液胞への S<sub>9</sub>-RNase の隔離は全く観察されなかったが、花粉管全体を観察できてはいないため、見逃している可能性も考えられた。連続的に作製した花柱の横断切片の中には、位置情報は不明であるが、多くの花粉管が観察できる。そこで、花粉管の形態からオルガネラの多い領域、核のある領域、大きな液胞がある領域に分けて、それらの花粉管に S<sub>9</sub>-RNase が隔離されていないかを検証した (Fig. 2-8)。それぞれ、50 枚以上の花粉管断面を確認したが、液胞等の特定区画への隔離は全く観察されなかった。この結果は、少なくとも受粉後 6 時間の段階では S<sub>9</sub>-RNase の隔離は起こっていないことを示唆している。逆に、和合・不和合花粉管の伸長に差が認められ始めるこの早期の時点で和合花粉管細胞質内の S<sub>9</sub>-RNase 密度の減少が観察された事実は、隔離モデルではなく分解モデルを強く支持する。

## 2-4 考察

本章では花粉管内に取り込まれた S-RNase の無毒化機構を解明する手がかりを得るために、免疫電子顕微鏡法を用いた花粉管内 S-RNase 定量法を確立し、和合、不和合受粉時の花粉管内における S-RNase の密度計測を行った。その結果、和合および不和合受粉における花粉管伸長の差が、受粉後 6 時間程度で現れる事を明らかにし、この時点において、S-RNase は不和合花粉管先端部位の細胞質に蓄積していること、和合花粉管では蓄積している S-RNase の量が不和合花粉管よりも少ないことを明らかにした。また、花粉管全体の観察から、S-RNase が液胞等の小胞に隔離されていないことを示した。これらの結果は SCF<sup>SLFs</sup> の S-RNase 無毒化機構が隔離モデルではなく、分解モデルのメカニズムであることを強く支持している。

本研究で特に興味深いことは S-RNase の分布が花粉管の先端で最も高く、尾部に向かって減少していることであった。雌ずい組織に存在する S-RNase が、どの様にして花粉管内に侵入し、花粉因子複合体 SCF<sup>SLFs</sup> と相互作用するのかは残された謎であるが、S-RNase は主に花粉管の先端部で取り込まれていることが示唆された。先端部で取り込まれた S-RNase は、不和合花粉では分解を免れ、花粉管内の mRNA を分解して、花粉管伸長に関わるタンパク質やエネルギー代謝に関わるタンパク質などの合成を抑制することにより、花粉管の伸長を阻害しているのであろう。2000 年に Cappadocia のグループから報告された免疫電子顕微鏡法による S-RNase の観察では、和合と不和合受粉で細胞質に局在する S-RNase 量に差は観察されなかった (Luu *et al.*, 2000)。S-RNase の存在量に差が観察されるのは花粉管の先端部のみであるから、Luu らと同じ方法で S-RNase の定量を行っていたら、同様に不和合と和合受粉で差が観察できなかった可能性が高いと考えられる。

最近になって、Xue らのグループは抗 S-RNase 抗体を用いた免疫電子顕微鏡実験により、S-RNase が不和合および和合花粉で主に細胞質に局在していることを報告した (Liu *et al.*, 2014)。また、Cappadocia のグループも、免疫電子顕微鏡観察による S-RNase の定量を再試し、和合花粉では不和合花粉よりも S-RNase が減少していること、また、S-RNase の局在は細胞質が主であるという先の論文結果を訂正する内容を報告した (Boivin *et al.*, 2014)。いずれの結果も本研究ほど高い精度で実験を行っていないため、花粉管の先端で S-RNase が蓄積することは観察できていないが、S-RNase の無毒化機構として分解モデルが支持される結果となった。

隔離説を主張する McClure らのグループの報告によると受粉から 16 時間後の和合、不和合花粉管および 36 時間後の和合花粉管では S-RNase の液胞膜内への隔離が観察され、一方、36 時間後の不和合花粉管においてのみ細胞質への S-RNase の拡散が観察されている (Goldraji *et al.*, 2006)。本論文においては、受粉後 6 時間では S-RNase の特定部位への集積は確認できず、S-RNase を囲む液胞膜様構造も観察されなかった。受粉後後期での観察は行わなかったため、この現象は受粉後非常に遅い時期に発生する可能性もあるが、前段で紹介した 2 つの最近の免疫電子顕微鏡観察は受粉後 6~24 時間の広い時間帯で S-RNase の観察を行っており、いずれも液胞等の小胞に隔離された S-RNase は存在しないと報告していることから (Liu *et al.*, 2014; Boivin *et al.*, 2014)、McClure らの観察は用いた抗体の非特異性等に基づくアーティファクトであった可能性が高いと思われる。

和合受粉の花粉管内では、侵入した S-RNase が花粉管先端の細胞質で分解されている可能性が高くなったが、本分解が 26S プロテアソームを介したものであるかは明確な証拠は得られていない。一般的には 26S プロテアソームの阻害剤である MG-132 処理により、ポリユビキチン化タンパク質の分解抑制を観察する実験が一般的に行われている。当研究室において、非自己 S-RNase の分解に対する本阻害剤の効果を期待し、花粉管を雌ずいの切断断面より MG-132 を含む培地上で露出伸長させることを試みたが (裏山, 2007)、花粉管伸長そのものについても強い阻害効果が見られたため、S-RNase に対する特異的な効果をみることはできなかった。一方、当研究室における S<sub>9</sub>-RNase の *in vitro* ユビキチン化および分解実験において、ポリユビキチン化された S<sub>9</sub>-RNase が花粉管抽出物中で速やかに分解されること、この分解が MG-132 添加により抑制されることが明らかとなった (Entani *et al.*, 2014)。今後は、*in vivo* における非自己 S-RNase のポリユビキチン化と 26S プロテアソームによる分解を観察することが分解モデルと隔離モデルの論争に決着をつける重要な実験となるであろう。

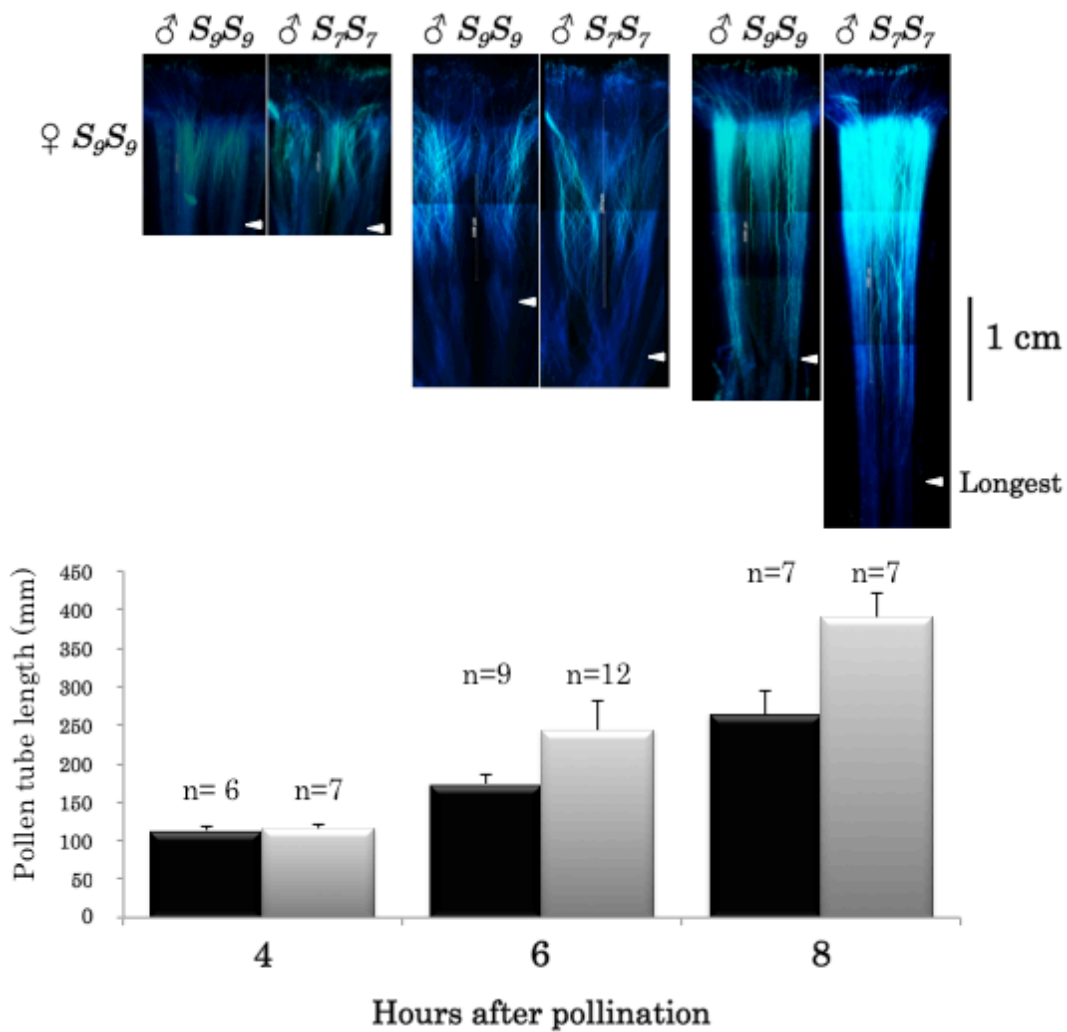
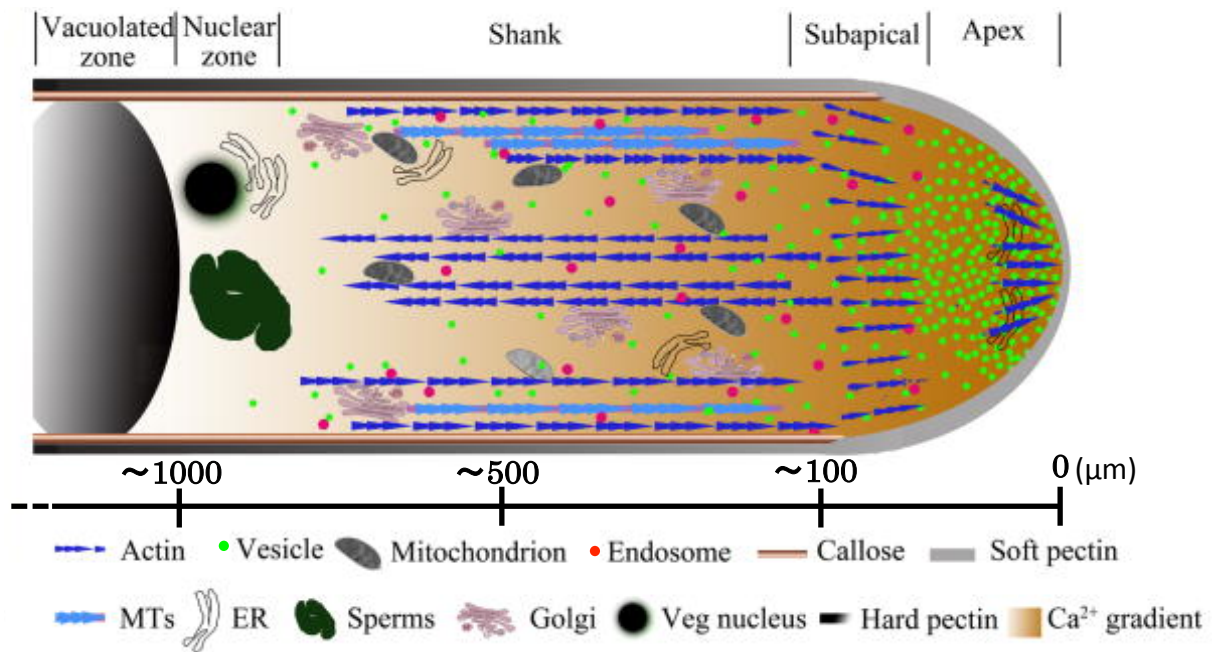


Fig. 2-1 和合および不和合受粉時の花粉管伸長

上：和合および不和合受粉 4、6、8 時間後の花粉管をアニリンブルー染色により観察した。矢尻は、最長花粉管の先端位置を示す。

下：受粉後の各時間における平均最長花粉管長と標準偏差を表す。n：受粉させて観察した雌ずいの数。

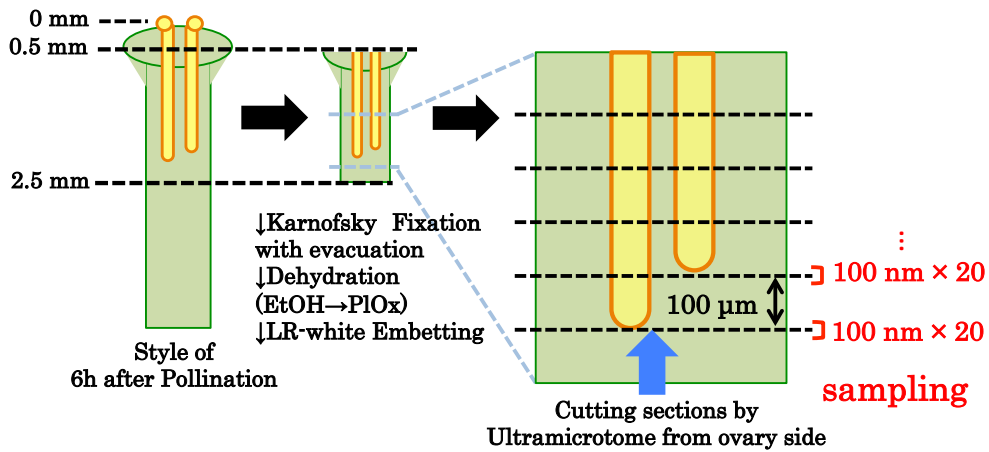


Qin *et al.*, 2011

Fig. 2-2 花粉管内細胞内小器官分布のモデル図

典型的な花粉管内の細胞内小器官の分布を示すモデル図 (Qin *et al.*, 2011) に、本研究で観察した電子顕微鏡像から示唆される受粉後 6 時間における花粉管先端からの位置情報を付加した。

A



B

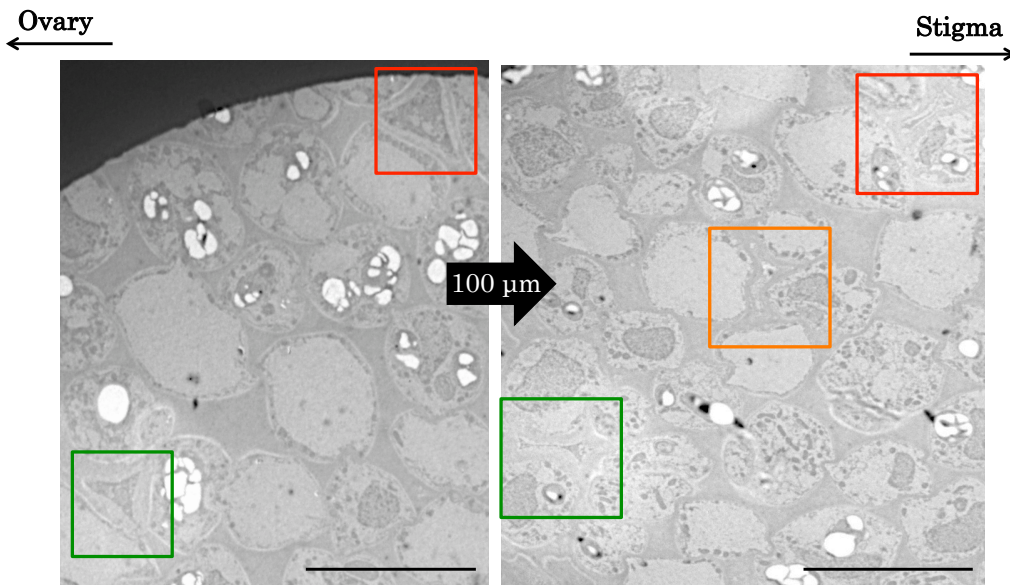
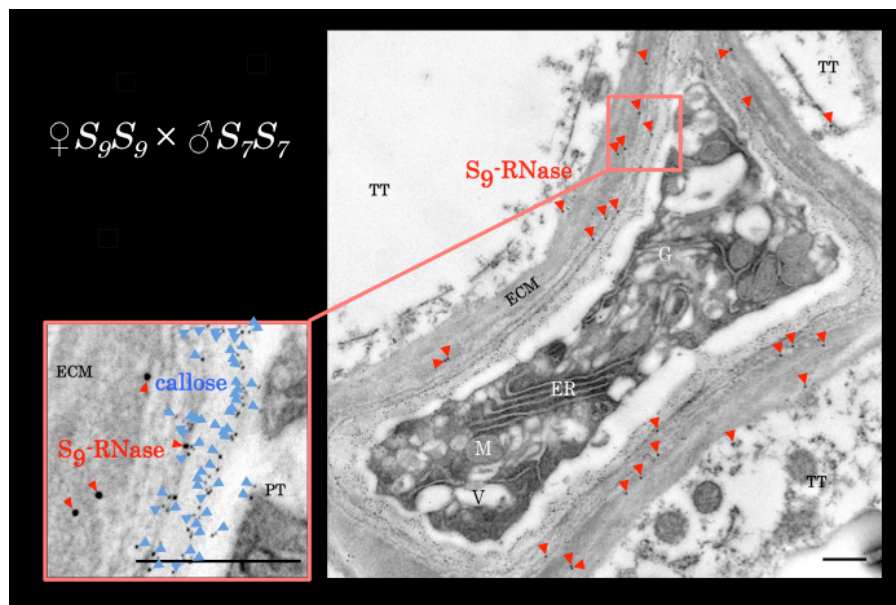


Fig. 2-3 免疫電子顕微鏡用試料作製法および連続した花粉管の特定法

A. 免疫電子顕微鏡用の雌ずい横断切片作製法。受粉後 6 時間の雌ずいより柱頭と子房側を切断した部分 (2 mm) を固定包埋した。包埋した試料は、子房側より 1 μm 厚の切片を順次作製していき、花粉管が出現した位置と、以降 100 μm 間隔の位置において、100 nm 厚の薄切片試料を 20 枚ずつ取得した。B. 同一雌ずいを 100 μm 間隔で観察した時の電子顕微鏡像の例。同色の四角中の花粉管をは同一の花粉管を示す。雌ずいの子房側から柱頭側に向かって連続的に観察することで、右画像のオレンジ色の四角内の花粉管の例の様に、個々の花粉管の先端部位 (0~100 μm) を捉えることが可能である。scale bars = 10 μm。



A



B

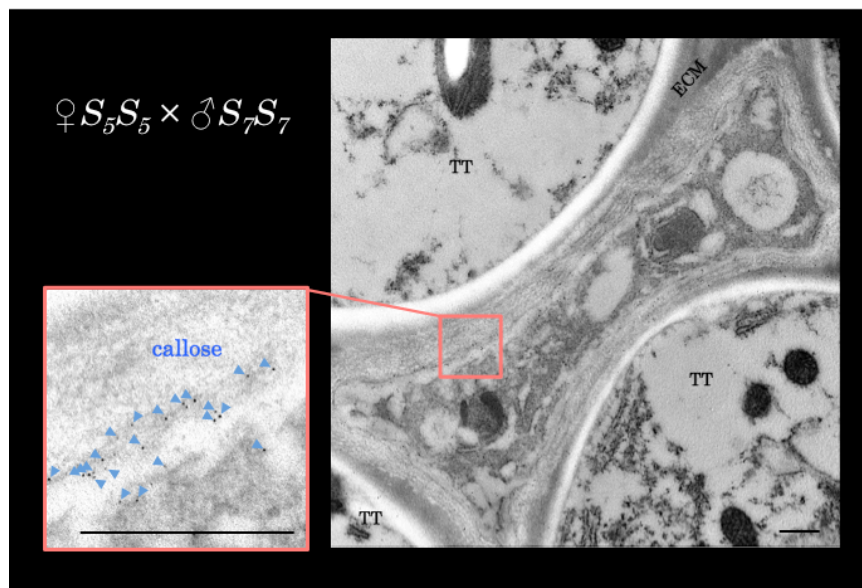


Fig. 2-4 抗 S<sub>9</sub>-RNase 抗体特異性の確認

S<sub>9</sub>S<sub>9</sub> 遺伝子型の雌ずい (A) と S<sub>5</sub>S<sub>5</sub> 遺伝子型の雌ずい (B) に S<sub>7</sub>S<sub>7</sub> 個体の花粉を各々受粉させた。受粉 6 時間後の雌ずい横断切片を、抗 S<sub>9</sub>-RNase 抗体および抗カロース抗体と反応させ、免疫電子顕微鏡像を取得した。赤の矢じりは、S<sub>9</sub>-RNase の局在を示す 15 nm 金粒子の位置、青の矢じりはカロースの局在を示す 5 nm の金粒子の位置を示す。S<sub>9</sub>-RNase の位置を示す 15 nm の金粒子は S<sub>9</sub>S<sub>9</sub> 遺伝子型の雌ずい (A) でのみ観察され、抗体の特異性が示唆される。TT: 通導組織細胞、ECM: 通導組織細胞外マトリクス、scale bars = 0.5 μm。

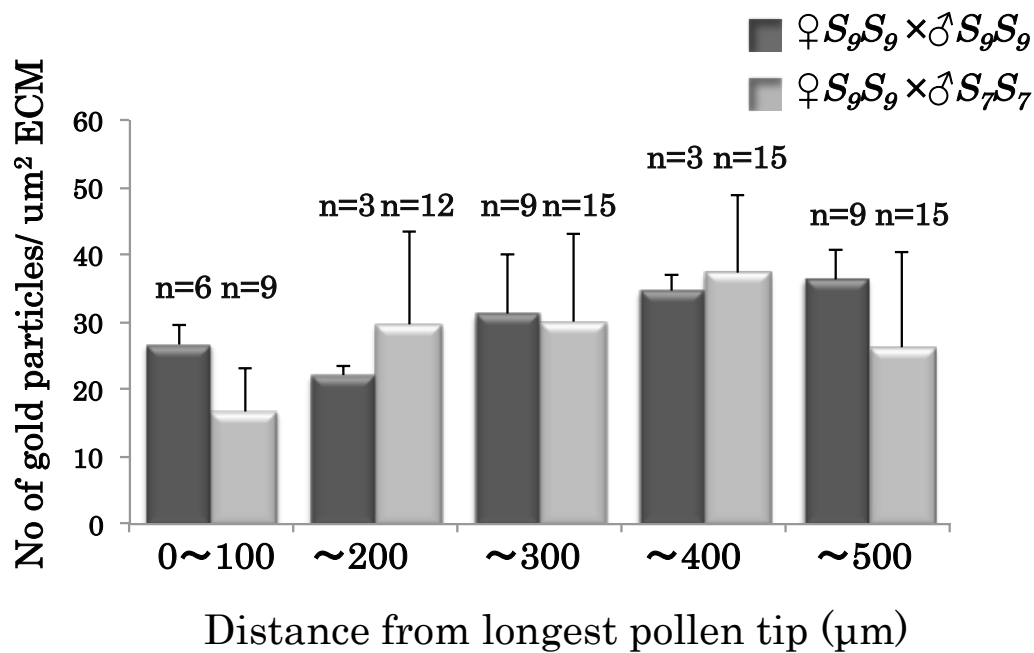


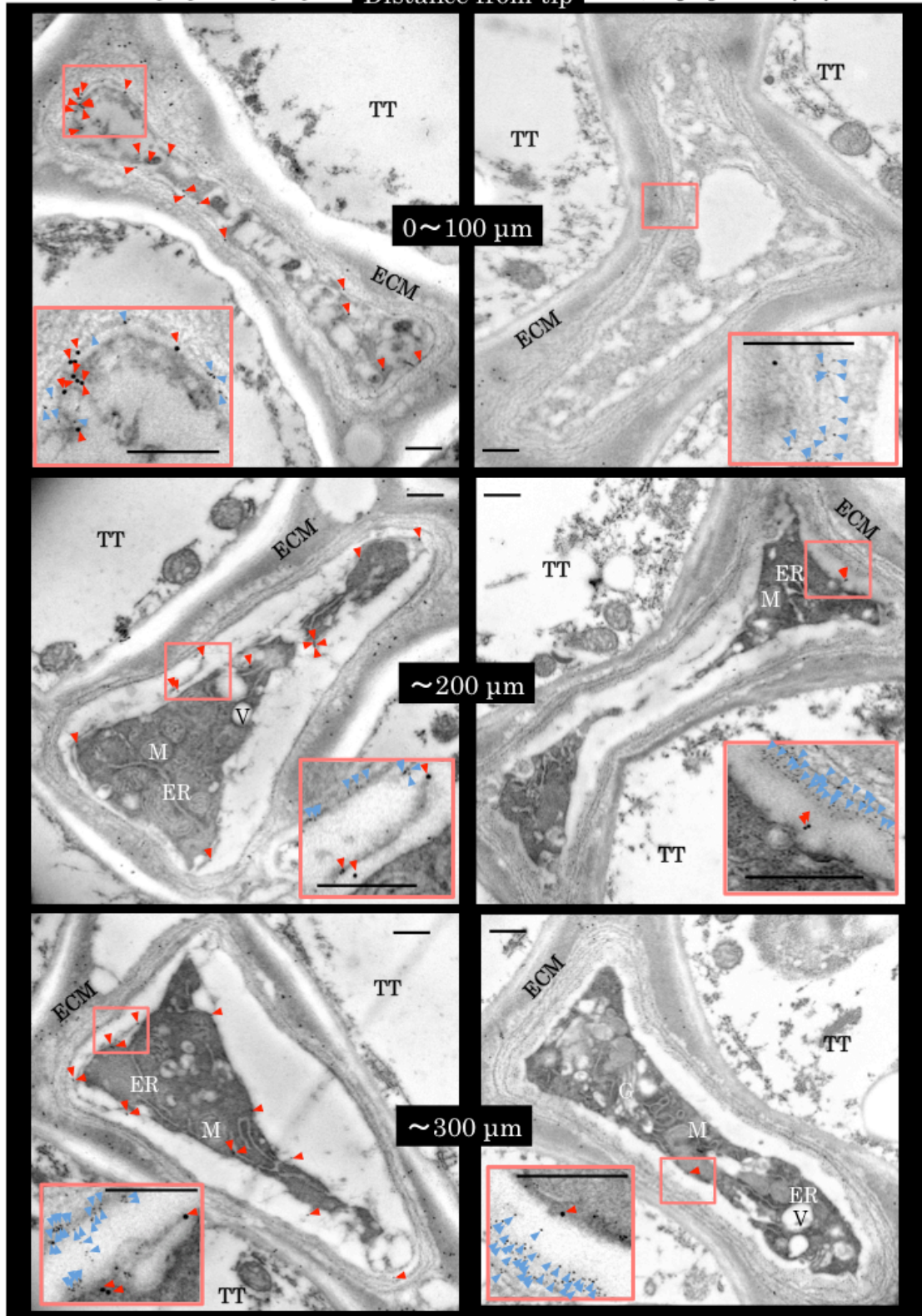
Fig. 2-5 通導組織細胞外マトリクスの S-RNase 免疫電子顕微鏡解析

和合および不和合受粉 6 時間後の雌ずい通導組織細胞外マトリクス部位における S-RNase 密度を  $1 \mu\text{m}^2$  あたりの 15 nm 金粒子の数で表記した。横軸は、最長花粉管の先端位置からの距離を示す。縦軸は、平均金粒子密度 + 標準偏差。各切片における金粒子密度は切片中の任意の 3 箇所 の 平均値として求めた。n は観察した切片数を表す。

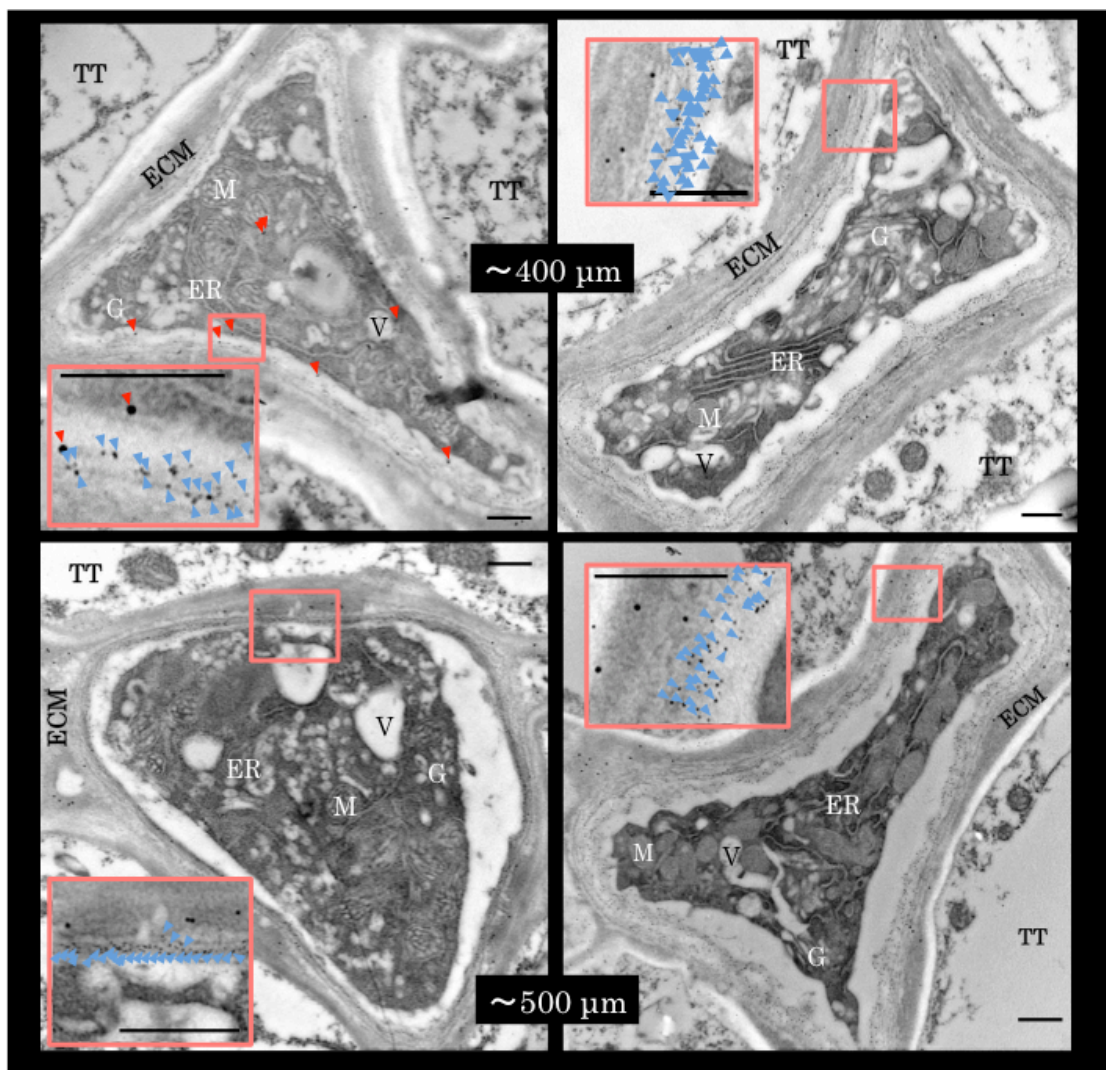
♀ $S_9S_9$  × ♂ $S_9S_9$

Distance from tip

♀ $S_9S_9$  × ♂ $S_7S_7$



(次ページにつづく)



**Fig. 2-6 和合不和合の花粉管内の S-RNase の観察**

和合および不和合受粉 6 時間後の花粉管内 S-RNase の観察。赤の矢じりは、15 nm 金粒子で標識された花粉管内 S-RNase、青は 5 nm 金粒子で標識されたカロースの局在を示す。TT: 通導組織細胞、ECM: 通導組織細胞外マトリクス、G: ゴルジ体、ER: 小胞体、M: ミトコンドリア、V: 液胞。scale bars = 0.5  $\mu\text{m}$ 。

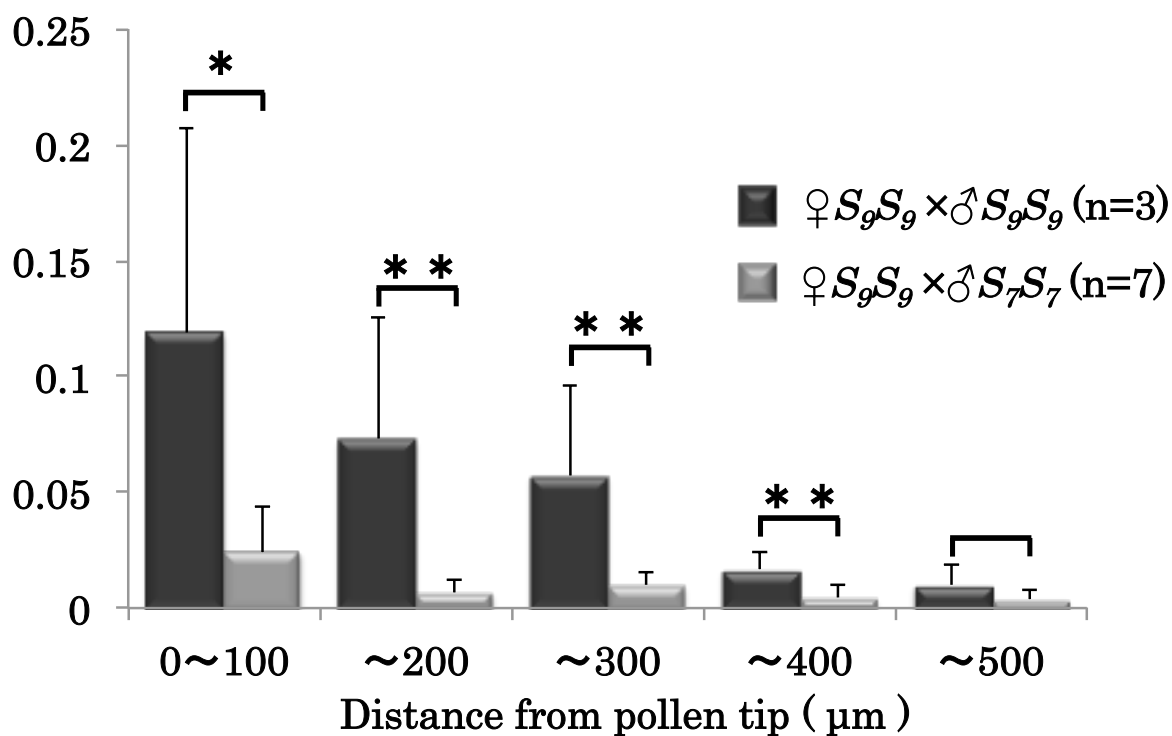
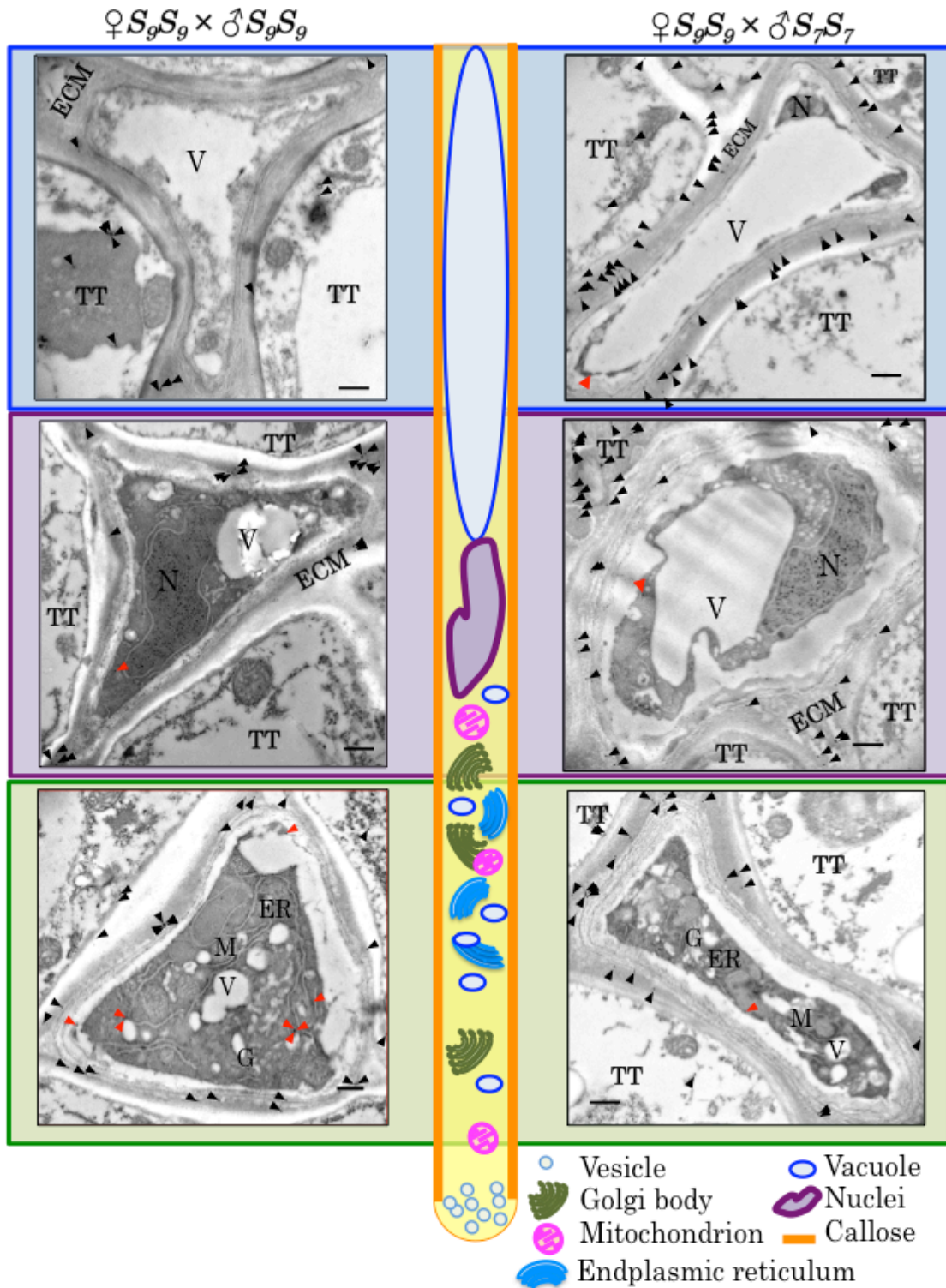


Fig. 2-7 和合および不和合受粉 6 時間後の花粉管先端における S-RNase の密度分布

受粉後 6 時間の和合および不和合受粉花粉管内 S-RNase の濃度分布。縦軸は、花粉管細胞内における S<sub>9</sub>-RNase に由来する金粒子の密度を細胞外マトリクスにおける金粒子密度を 1 とした時の相対値で表す。横軸、花粉管先端からの距離を表す。\*P<0.05, \*\*P<0.01。



**Fig. 2-8 S-RNase 細胞内局在**

赤矢じりは 15 nm 金粒子で標識された花粉管内の S-RNase、黒矢じりは花粉管外 S-RNase の位置を示す。TT：通導組織細胞、ECM：通導組織細胞外マトリクス、V：液胞、N：核、G：ゴルジ体、ER：小胞体、M：ミトコンドリア。  
 scale bars = 0.5  $\mu$ m。

## 総括

自家不和合性は、その発見は世紀をまたぎ、その性質は遺伝的にも育種学的にも注目されている。S-RNase 型自家不和合性が、協調的非自己認識機構という他の自家不和合性自他識別機構と比べて非常に複雑な仕組みをもつことは、多くの研究者の興味を惹きつけ、世界中で様々な角度から研究が行われている。本論文で取り上げた不和合花粉の選択的排除機構についても、徐々に実態が解明される一方で、未解明の部分も多く残されている。

本研究を始めた時点では、SLF の構成する複合体の構成として典型的 SCF および非典型的 SCF モデルが提出されており、いずれの場合も当研究室で得られた SLF 複合体の MS 解析の結果とは異なる CUL1-G が構成成分であると考えられていた。また、S-RNase の無毒化機構については分解モデルと隔離モデルが主張され、コンセンサスが得られない状態であった。そこで、本研究では SLF が形成する複合体の内、特に CUL1 の実体を解明・検証すること、さらに、組織免疫学的解析から S-RNase の無毒化機構について結論を下すことを目的に研究を行った。

第 1 の課題については、葯または花粉で発現する 5 つの *CUL1* を同定し、MS 解析のフラグメントの本体が *CUL1-P* であることを明らかにした。*CUL1-P* が *SLF* や *SSK1* と同じく葯と花粉で特異的に発現しており、*SLF* や *SSK1* と相互作用して複合体を形成すること、さらに *CUL1-P* の発現を抑制すると非自己 S-RNase の無毒化が全体的に損なわれることを示し、*CUL1-P* が SLFs の形成する典型的 SCF 複合体の主要な *CUL1* であることを明らかにすることができた。

また、第 2 の課題については、免疫電子顕微鏡観察による花柱を伸長中の花粉管における S-RNase 定量法を確立し、不和合花粉管の先端の細胞質内で S-RNase が蓄積していること、和合・不和合花粉管のいずれの場合も液胞等の特定区画に S-RNase が隔離されていないことを示し、隔離モデルではなく分解モデルが支持されることを明らかにした。

最後に、本研究とこれまでに得られている知見をもとに推定される S-RNase 型自家不和合性の分子機構モデル図を示す (Fig. 3)。雌ずい内を伸長中の花粉管には、何らかの機構でその先端部位から雌ずい因子 S-RNase が花粉管内に侵入する。花粉管内では多くの花粉因子 SLFs が、花粉管特異的発現を示す *SSK1* と *CUL1-P*、さらに *Rbx1* を含む形で典型的 SCF<sup>SLFs</sup> 複合体を形成しており、侵入してきた S-RNase と接触する。和合受粉の際には、花粉管に侵入した非自己 S-RNase は、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体のいずれかにより認識され、ポリユビキチン化され

る。ポリユビキチン化された S-RNase は 26S プロテアソームにより花粉管の先端で即座に分解されると考えられる。一方、不和合受粉では花粉管の先端に S-RNase が蓄積することにより、RNA が分解され、タンパク質合成が阻害され、花粉管の伸長が抑制される。

今後、本研究を元にさらに S-RNase 型自家不和合性メカニズムの解明が進むことを期待したい。



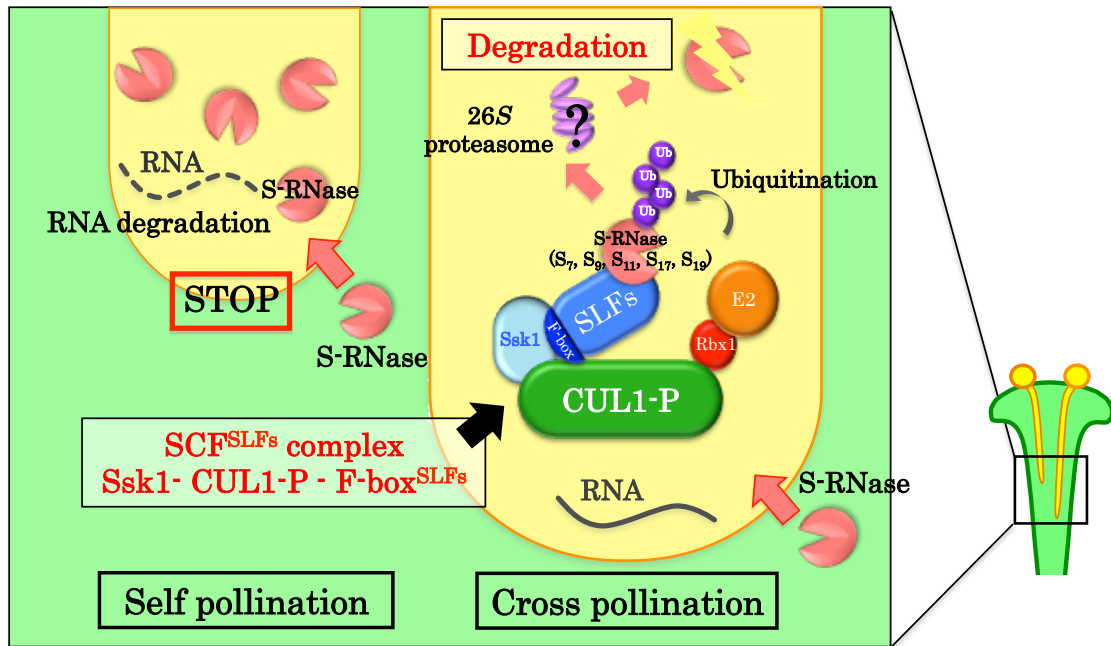


Fig. 3 ナス科植物 S-RNase 型自家不和合性分子機構の新規モデル図

## 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 2011 年 4 月から 2015 年 1 月の約 4 年間にわたり行われました。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心から感謝申し上げます。一学生として、自身のことで精一杯でしたが、私を含めた学生および教員の方々の研究すべてに真摯に向き合われるお姿には心より敬服致しました。昨今稀にみる出来の悪い学生ではありましたが、もどかしく思いながらも最後まで諦めずにご指導頂いた事、心より感謝申し上げます。また、研究費の取得が難しい現在にもかかわらず、我々に非常に恵まれた研究環境を与えて下さり、本当にありがとうございました。

電子顕微鏡を一から丁寧に教えて頂いた岩野恵助教、生化学実験および私のつたない文章についてご指導賜りました村瀬浩司助教、分子生物学的実験および系統解析にご指導頂きました藤井壮太助教には、すがりつく私を見放さず、辛抱強くご支援頂き、心より感謝しております。また柴博史助教、和田七夕子助教に厚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円谷徹之博士、久保健一博士、下里裕子博士、垣田満博士、三浦栄子博士には心より感謝いたします。電子顕微鏡でお世話になりました市川ひとみ氏、実験植物の栽培や管理においてお世話になりました児玉房子氏、後藤洋子氏に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阿部愛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、常に自分のことで精一杯で不機嫌な私にも優しく接して頂き、本当にありがとうございました。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、橋本隆教授、梅田正明教授には、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。

実験のいろはからご指導頂いた山形大学農学部三橋渉教授、豊増知伸教授そして佐々武史名誉教授には、研究の面白さを教えて頂きました。慶応義塾先端生命科学研究所で出会い、今は世界各国で活躍するPh. Dの友人達の存在は、研究活動をする上で私の大きな励みとなりました。また、本学へ快く送り出して下さいました京都大学大学院薬学研究科石濱泰教授、杉山直之准教授、富山大学

薬学部薬学研究科中野実教授には厳しいながらも愛情のこもったご指導を賜りましてありがとうございました。

共に研究生活を励まし合った津留麻美、Po Yu-Chen、五十嵐元子を含む数多くの友人、私の体を心配していつもご飯や差し入れをくれ、話をきいてくれた吉村裕子、森恵里、奈良真弓、市川ひとみ、阿部愛、前田順子は、奈良の友人であり母のようでした。本当にありがとうございました。

最後に、両親と共に、家庭を顧みず必死に研究活動を行う私を常にサポートし、理解を示してくれた夫、Luiz Gustavo Moreira Sampaioに心から感謝申し上げます。

## 参考文献

- Ai, Y., Kron, E. & Kao, T.-h. (1991). S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Molecular and general genetics*, 230, 353–358.
- Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S.-L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R. J., Roche, P. J., Haley, J. D., Penschow, J. D., Niall, H. D., Tregear, G. W., Coghlan, J. P., Crawford, R. J., & Clarke, A. E. (1986). Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 321, 38–44.
- Boivin, N., Morse, D., & Cappadocia, M. (2014). Degradation of S-RNase in compatible pollen tubes of *Solanum chacoense* inferred by immunogold labeling. *Journal of Cell Science*, 127, 4123-4127
- Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I., & Clarke, A. E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 326, 99–102.
- De Nattencourt, D. (2001). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated plants. *Springer-Verlag. (edn2)*.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F.-S., Isogai, A., & Takayama, S. (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells*, 8, 203–213.
- Entani, T., Kubo, K., Isogai, S., Fukao, Y., Shirakawa, M., Isogai, A., & Takayama, S. (2014). Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of S-RNase in a solanaceous cross-compatibility reaction. *The Plant Journal*, 78, 1014–1021.
- Entani, T., Takayama, S., Iwano, M., Shiba, H., Che, F. S., & Isogai, A. (1999). Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 1882–1888.

- Franklin-Tong, V. E. (2008). *Self-Incompatibility in Flowering Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends in Plant Science*, *10*, 251–256.
- Gerola, P. D., Mol, C. a., Newbigin, E., & Lush, W. M. (2000). Regulation of LAT52 promoter activity during pollen tube growth through the pistil of *Nicotiana alata*. *Sexual Plant Reproduction*, *12*, 347–352.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-Garcia, F., & McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, *439*, 805–810.
- Hua, Z., Fields, A., & Kao, T.-H. (2008). Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Molecular Plant*, *1*, 575–585.
- Hua, Z., & Kao, T.-H. (2006). Identification and characterization of components of a putative *petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, *18*, 2531–2553.
- Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 299–334.
- Huang, J., Zhao, L., Yang, Q., & Xue, Y. (2006). AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *The Plant Journal*, *46*, 780–793.
- Huang, S., Lee, H. S., Karunanandaa, B., & Kao, T.-H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell*, *6*, 1021–1028.
- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., & Kao, T.-H. (1991). Sexual Plant lleproduction Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, *4*, 81–87.

- Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Shinkawa, T., Natsuka, S., Hase, S., Miyagi, M., Sakiyama, F., & Norioka, S. (1999). Presence of asparagine-linked *N*-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *263*, 624–634.
- Iwano, M., & Takayama, S. (2012). Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*, 78–83.
- Jin, J., Ang, X. L., Shirogane, T., & Wade Harper, J. (2005). Identification of substrates for F-box proteins. *Methods in Enzymology*, *399*, 287–309.
- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q., & Napoli, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, *31*, 957–973.
- Kao, T.-H., & McCubbin, A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*, 12059–12065.
- Karunanandaa, B., Huang, S., & Kao, T.-H. (1994). Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *The Plant Cell*, *6*, 1933–1940.
- Kobayashi, A., Sakamoto, A., Kubo, K., Rybka, Z., Kanno, Y., & Takatsuji, H. (1998). Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in *Petunia*. *The Plant Journal*, *13*, 571–576.
- Komander, D., & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 203–229.
- Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.-H., & Takayama, S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, *330*, 796–799.

- Kubo, K., Paape, T., Hatakeyama, M., Entani, T., Takara, A., Kajihara, K., Tsukahara, M., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K. K., & Takayama, S. (2015). Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Nature Plants*, *1*, 14005.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., & Xue, Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology*, *50*, 29–42.
- Lee, H. S., Huang, S., & Kao, T.-H. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, *367*, 560–563.
- Li, J.-F., Chung, H. S., Niu, Y., Bush, J., McCormack, M., & Sheen, J. (2013). Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants. *The Plant Cell*, *25*, 1507–1522.
- Li, S., Sun, P., Williams, J. S., & Kao, T.-H. (2014). Identification of the self-incompatibility locus F-box protein-containing complex in *Petunia inflata*. *Plant Reproduction*, *27*, 31-45.
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2010). A pollen factor linking inter- and intraspecific pollen rejection in *tomato*. *Science*, *330*, 1827–1830.
- Li, W., & Chetelat, R. T. (2013). The role of a pollen-expressed Cullin1 protein in gametophytic self-Incompatibility in *Solanum*. *Genetics*, *196*, 439-442.
- Liu, W., Fan, J., Li, J., Song, Y., Li, Q., Zhang, Y., & Xue, Y. (2014). SCF<sup>SLF</sup>-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Frontiers in Genetics*, *5*.
- Luu, D., Qin, X., Morse, D., & Cappadocia, M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, *407*, 649–651.

- Matsumoto, D., Yamane, H., Abe, K., & Tao, R. (2012). Identification of a Skp1-like protein interacting with SFB, the pollen S determinant of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. *Plant Physiology*, *159*, 1252–1262.
- Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., & Cappadocia, M. (1997). Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition. *The Plant cell*, *9*, 1757–1766.
- McClure, B., Cruz-Garcia, F., & Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of botany*, *108*, 647–658.
- McClure, B., Gray, J. E., Anderson, M. A., & Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, *347*, 757–760.
- McClure, B., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., & Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature*, *342*, 955–957.
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., & Bernatzky, R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 13548–13553.
- Meikle, P. J., Bonig, I., Hoogenraad, N. J., Clarke, A. E., & Stone, B. A. (1991). The location of (1→3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1→3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta*, *185*, 1–8.
- Minamikawa, M., Koyano, R., Kikuchi, S., Koba, T., & Sassa, H. (2014). Identification of SFBB-containing canonical and noncanonical SCF complexes in pollen of apple (*Malus × domestica*). *PloS one*, *9*, e97642.
- Murfett, J., Atherton, T. L., Mou, B., Gasser, C. S., & McClure, B. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, *367*, 563–566.



- Murfett, J., Strabala, T. J., Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., & McClure, B. (1996). S-RNase and Interspecific Pollen Rejection in the Genus *Nicotiana*: Multiple Pollen-Rejection Pathways Contribute to Unilateral Incompatibility between self-Incompatible and self-compatible Species. *The Plant cell*, *8*, 943–958.
- Newbigin, E., Paape, T., & Kohn, J. R. (2008). RNase-based self-incompatibility: puzzled by *pollen S*. *The Plant cell*, *20*, 2286–2292.
- Oxley, D., & Bacic, A. (1996). Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana alata*. *European journal of biochemistry / FEBS*, *242*, 75–80.
- Qiao, H., Wang, H., Zhao, L., Zhou, J., Huang, J., Zhang, Y., & Xue, Y. (2004). The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *The Plant cell*, *16*, 582–595.
- Qin, Y., & Yang, Z. (2011). Rapid tip growth: insights from pollen tubes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *22*, 816–824.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*, 539–542.
- Royo, J., Kunz, C., Kowyama, Y., Anderson, M. A., Clarke, A. E., & Newbigin, E. (1994). Loss of a histidine residue at the active site of *S*-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*, 6511–6514.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*, 671–675.
- Schulman, B. a, Carrano, a C., Jeffrey, P. D., Bowen, Z., Kinnucan, E. R., Finnin, M. S., Elledge, S. J., Harper, J. W., Pagano, M., & Pavletich, N. P. (2000). Insights

- into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, *408*, 381–386.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *18*, 1121–1133.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*, 539-545.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., & Kao, T.-H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, *429*, 302–305.
- Stehmann, J. R., Lorenz-Lemke, A. P., Freitas, L. B. and Semir, J. (2009). *The genus Petunia*. In *Petunia*. (T. Gerats & J. Strommer, Eds.), New York, NY: Springer New York.
- Sun, P., & Kao, T.-H. (2013). Self-incompatibility in *Petunia inflata*: the relationship between a self-incompatibility locus F-box protein and its non-self S-RNases. *The Plant Cell*, *25*, 470–485.
- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *56*, 467–489.
- Tsai, D., Lee, H., Post, L. C., Kreiling, K. M., & Kao, T.-H. (1992). Sexual Plant Reproduction Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sexual Plant Reproduction*, *5*, 256–263.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Masada, M., Zhu, X., Marchesi, E., & Kao, T.-H. (1999). Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sexual Plant Reproduction*, *12*, 6–13.

- Tsukamoto, T., Ando, T., Takahashi, K., Omori, T., Watanabe, H., Kokubun, H., Marchesi, E., & Kao, T.-H. (2003). Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology*, *131*, 1903–1912.
- Twell, D., Yamaguchi, J., & McCormick, S. (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development*, *109*, 705–713.
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R., & Hirano, H. (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell*, *15*, 771–781.
- Van Rechem, C., Black, J. C., Abbas, T., Allen, A., Rinehart, C. a, Yuan, G.-C., Dutta, A., & Whetstine, J. R. (2011). The SKP1-Cul1-F-box and leucine-rich repeat protein 4 (SCF-FbxL4) ubiquitin ligase regulates lysine demethylase 4A (KDM4A)/Jumonji domain-containing 2A (JMJD2A) protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 30462–30470.
- Voigt, J., & Papalopulu, N. (2006). A dominant-negative form of the E3 ubiquitin ligase Cullin-1 disrupts the correct allocation of cell fate in the neural crest lineage. *Development*, *133*, 559–568.
- Wang, C.-L., Xu, G.-H., Jiang, X.-T., Chen, G., Wu, J., Wu, H.-Q., & Zhang, S.-L. (2009). S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* *in vitro*. *The Plant Journal*, *57*, 220–229.
- Wang, Y., Tsukamoto, T., Yi, K.-W., Wang, X., Huang, S., McCubbin, A. G., & Kao, T.-H. (2004). Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility (*S-*) locus and gene identification in an 881-kb contig containing S2-RNase. *Plant molecular biology*, *54*, 727–742.
- Woodward, J. R., Craik, D., Dell, A., Khoo, K. H., Munro, S. L., Clarke, A. E., & Bacic, A. (1992). Structural analysis of the N-linked glycan chains from a stylar

glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Glycobiology*, 2, 241–250.

Yamane, H., Ushijima, K., Sassa, H., & Tao, R. (2003). The use of the *S* haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for *S*-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107, 1357–1361.

Zhao, L., Huang, J., Zhao, Z., Li, Q., Sims, T. L., & Xue, Y. (2010). The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Journal*, 62, 52–63.

Zheng, N., Schulman, B. a, Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W., & Pavletich, N. P. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box<sup>Skp2</sup> SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416, 703–709.

菊池博之. (2012). ナス科植物の自家不和合性に関与する花粉側因子 SLF の局在および発現の解析. 修士論文. (奈良先端科学技術大学院大学)

裏山悟司. (2007). ナス科植物ペチュニアの自家不和合性に関わる花粉管内タンパク質の解析. 修士論文.(奈良先端科学技術大学院大学)

円谷徹之. (2001). ナス科植物 *Petunia hybrida* の自家不和合性遺伝子の解析. 博士論文. (奈良先端科学技術大学院大学)

## Supplemental Table 1 本研究で用いたプライマー配列のリスト

Name	Primer (5' - 3')	Purpose
CUL1PB-U1	GCCAAGAAAGTTCTAACTC	F quantitative PCR
CUL1A-L3	AGGTCTCTTTCCAAGTAGTCTCTG	R quantitative PCR
CUL1B-L3	CGGTCTCTTTCCAGGTAGTCTCGA	R quantitative PCR
CUL1C-U3	GAGTCGTAAAGTATTGGCTC	F quantitative PCR
CUL1C-L3	TATCAAATCTTCAATTCTCTTC	R quantitative PCR
CUL1E-U4	GAGTCGCAAAGTTCTACCTC	F quantitative PCR
CUL1E-L3	TGTCTCTTTCCAAGTAATCTCGG	R quantitative PCR
CUL1DG-qRT-U2	GAGTCGTAAAGTATTGGCTC	F quantitative PCR
CUL1DG-qRT-L2	TGAAATCAGGCTTAAACAAG	R quantitative PCR
PhSSK1-qRT-U	GACACTAAAATCAAACGATGACCAA	F quantitative PCR
PhSSK1-qRT-L	TCATGTTCTTGAGCATTTTCAGATTG	R quantitative PCR
pBISLF-U2	GATCAATCGACTGCTCAAGGAAAA	F quantitative PCR
pBISLF-L1	AAACCGTTAAAATCTGTGAACCTGTGTC	R quantitative PCR
TC16-U2	CCTAACCGGCAAAAACATCACCT	F quantitative PCR/genotyping
TC16-L2	GCACTTATCAACAACAGGACGACAACA	R quantitative PCR/genotyping
sCUL1_DN-F	GCGGATCCATGGCGGAGGAAGCAGAGGAG	F <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> construction/genotyping
sCUL1_DN-R	GCGAGCTCTCAAAGCTTGACCGCTTG	R <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> construction/genotyping
uCUL1_DN-F	GCGGATCCATGACGATCAAACAAATGA	F <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> construction/genotyping
uCUL1_DN-R	GCGAGCTCTCAAAGCTTAAACCACCTTA	R <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> construction/genotyping
Lat52pro-U4	CACAAAGAGAAGGAGCAATAAAAATAAAAG	F genotyping for transformants
NosR	ACCGGCAACAGGATTCAATC	R genotyping for transformants
Lat52pro-A	CCCAGAATCGATCATTCCTCAA	R genotyping for transformants
Venus-U1	TCGTGACCACCTGGGGCTAC	F genotyping for transformants
CUL1A-U6	ATAACAAGGCCGAAAATTCA	F <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
CUL1A-L4	TAATATCATCACTAGTTGCTCG	R <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
uCUL1-U5	GTTGGAGCCTGTTGCAAAG	F <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
uCUL1-L5	TTCCTCAATGGCATCATCGCTG	R <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
CUL1A-U5	CTTGGGCGATGATGATTTGGTT	F <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
CUL1A-L3	AGGTCTCTTTCCAAGTACTCTCTG	R <i>CUL1-P<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
uCUL1-U4	GTTGGCCAAGGAACATCAGAAT	F <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
uCUL1-L4	AGCTTCAAACCTTGCCATTGATGTG	R <i>CUL1-G<sup>DN</sup></i> quantitative RT-PCR
miR319a-F	ATATGGATCCACAAACACCGCTCGGACG	F miR319a cloning
miR319a-R	ATATGAGCTCGGCGATGCTTAAATAAAG	R miR319a cloning
A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	F amiR construction
M13R	GGAAACAGCTATGACCATG	R amiR construction
culS-AmiR-1_I	GATTTTGACTCACTATCCAACATCTCTCTTTTGTATTCC	R amiR construction
culS-AmiR-1_II	GATAGTTGGATAGTGTGATGTCAAAATCAAAGAGAATCAATGA	F amiR construction/genotyping
culS-AmiR-1_III	GATAATTTGGATAGTGTGTCAAATTCACAGGTCGTGATATG	R amiR construction/genotyping
culS-AmiR-1_IV	GAATTTGACACACTATCCAATTATCTACATATATATTCT	F amiR construction
culU-AmiR-2_I	GATAAATCCATCTGTACTCACTTTCTCTCTTTTGTATTCC	R amiR construction
culU-AmiR-2_II	GAAAGTGAGTACAGATGGATTCTTCAAAGAGAATCAATGA	F amiR construction/genotyping
culU-AmiR-2_III	GAAAATGAGTACAGAAGGATTTTTCACAGGTCGTGATATG	R amiR construction/genotyping
culU-AmiR-2_IV	GAAAAATCCTTCTGTACTCATTTTCTACATATATATTCT	F amiR construction
CUL1P-CDS-F1_pFAST	ATGGATCCATGGCGGAGGAAGCAGAGGAG	F recombinant protein
CUL1P-NTD-Xho1-R	ATCTCGAGTCACTGTTTACAGAAAATCTC	R recombinant protein
CUL1B-CDS-F1_pFAST	ATGGATCCATGGCGGAGGAGACT	F recombinant protein
CUL1BG-NTD-Xho1-R	ATCTCGAGTCACTTTGTTACAGAAAGACCTC	R recombinant protein
CUL1C-CDS-F1-sma1_pGEX	ATATCCCGGTCATGAACCAGCGCAGCAC	F recombinant protein
CUL1C-NTD-Not1-R	ATGCGGCGGCTCATTGTTGCAAAAAACCTC	R recombinant protein
CUL1E-CDS-F1_pFAST	ATGGATCCATGGCGATGAGTCAAG	F recombinant protein
CUL1E-NTD-Xho1-R	ATCTCGAGTCACTTATTACAGAAAGACCTC	R recombinant protein
CUL1G-CDS-F1_pFAST	ATGGATCCATGACGATCAAACAATGA	F recombinant protein
CUL1P-V342D_F350D-F	CATGAGCAGGACTTTGACAAAAGGCGGATGAGCTGCATGACAAG	F mutation for recombinant protein
CUL1P-V342D_F350D-R	CTTGTATGACGCTCATCCGCTTCTTGTCAAAGTCCCTGCTCATG	R mutation for recombinant protein
CUL1B-V342D_F350D-F	CATGAGCAGGACTTTGACAAAAACGAGATGAGCTGCATGACAAG	F mutation for recombinant protein
CUL1B-V342D_F350D-R	CTTGTATGACGCTCATCTGCGTTTTTGTCAAAGTCCCTGCTCATG	R mutation for recombinant protein
CUL1C-V340E_I348E-F	CAGGAGCAGGTTTTTGAACGGAAAGTCAAGAGCTTCATGATAAA	F mutation for recombinant protein
CUL1C-V340E_I348E-R	TTTATCATGAAGCTCTTCGACTTTCGGTTCAAACCTGCTCCTG	R mutation for recombinant protein
CUL1E-V342E_I350E-F	GGGGAGCAGGCTTTTGATAGAAAAGTTGGAAGAGCTTCACGACAAG	F mutation for recombinant protein
CUL1E-V342E_I350E-R	CTTGTGCGTGAAGCTCTTCCAACCTTCTATCAAAGACCTGCTCCC	R mutation for recombinant protein
CUL1DG-I341E_I349E-F	CAGGAGCAGGCTTTGAAAGGAAGGTTGAAGAGCTGCATGACAAG	F mutation for recombinant protein
CUL1DG-I341E_I349E-R	CTTGTATGACGCTCTTCAACCTTCTTCAAAGACCTGCTCCTG	R mutation for recombinant protein
CUL1C-CDS-F1-sma1_pFast	ATATCCCGGATGAACCAGCGCAGCAC	F recombinant protein
CUL1C-NTD-Not1-R	ATGCGGCGGCTCATTGTTGCAAAAAACCTC	R recombinant protein