

## 論文内容の要旨

申請者氏名 塚原 麻伊

多くの植物は自家不和合性を有し、自殖を回避して種の遺伝的多様性を保持している。自家不和合性における自他識別は *S* 遺伝子座にコードされた多型性の花粉因子と雌ずい因子の相互作用を介して行われている。ナス科植物の雌ずい因子は RNA 分解酵素(S-RNase)であり、花粉管 RNA を分解する細胞毒として機能するのに対し、花粉因子は多数の F-box タンパク質群(SLFs)であり、非自己の S-RNase を分担して無毒化すると推察されている。しかし、SLFs が形成すると予測される SCF 複合体の構成因子や無毒化機構については議論が分かれており、未解決であった。そこで本研究ではナス科植物 *Petunia hybrida* を対象に、SLFs が形成する SCF 複合体の構成成分候補の Cullin1 (CUL1)の実体と、S-RNase の無毒化機構を明らかにする事を目的とした。

申請者の研究室では、花粉内で発現させた Flag タグを付加した S<sub>7</sub>-SLF2 との共沈実験により、当該 SLF 分子種には、SKP1 様分子 (SSK1)と Rbx1 に加え、CUL1 様分子 (CUL1-P) が結合していることを明らかにしてきた (円谷ら, 2014)。この CUL1-P がすべての SLFs が形成する SCF 複合体の構成成分であるかどうかを確認するために、まず網羅的トランスクリプトーム解析を行い、花粉では 5 種類の CUL1 分子種 (CUL1-P, G, B, C, E)が発現していることを見出した。これらの発現を定量 PCR 法により器官別に比較解析したところ、CUL1-P のみが花粉、特に発達段階の葯において顕著に高い発現を示し、SSK1 および SLFs と類似した発現様式を示すことを確認した。

次に、CUL1-P の機能を解析するために、CUL1-P と、従来候補とされた CUL1-G の発現抑制形質転換体を作成して受粉試験を行った。その結果、CUL1-P の発現を抑制した花粉が特異的に他家不和合性を示すことが判明し、CUL1-P が様々な S-RNase (S11-, S17-, S19-RNase)の無毒化において機能していることが強く示唆された。

さらに、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体における CUL1 分子種の関与をタンパク質相互作用から解析した結果、花粉で発現する 5 種類の CUL1 分子種の中で、CUL1-P が特異的に SSK1 および SLFs と複合体を形成することが示され、CUL1-P が雌ずい因子 S-RNase の無毒化に寄与していることが強く示唆された。

次に、SCF<sup>SLFs</sup> 複合体による非自己 S-RNase の無毒化機構を明らかにするために、他家および自家受粉花粉管内の S-RNase 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。その結果、S-RNase は自家花粉管の先端部位に特異的に局在していることが判明し、花粉管先端より取り込まれた S-RNase が他家花粉管では特定の領域に隔離されることなく分解を受けている事が強く示唆された。

本研究により、*P. hybrida* の花粉において、CUL1-P が花粉因子 SLFs と共に SCF 複合体を形成し非自己 S-RNase のユビキチン化に関与していること、ユビキチン化された S-RNase は分解によって無毒化されていることを強く示唆することができた。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 塚原 麻伊

ナス科植物の自家不和合性では、雌ずい因子である RNA 分解酵素 (S-RNase) が細胞毒として自己花粉管の伸長を阻害するのに対し、花粉因子である多数の F-box タンパク質群 (SLFs) が非自己由来 S-RNase を分担して無毒化することで非自己花粉管の伸長を保証するという、協調的非自己認識機構が提唱されてきた。しかし、S-RNase 無毒化に関わる SLFs 複合体の構成分子の実体や無毒化の具体的な分子機構については、異なる説が報告されており、統一見解は存在しなかった。

そこで申請者は、ナス科のペチュニア (*Petunia hybrida*) における S-RNase の無毒化機構を明らかにすることを目的として、第 1 章では分子生物学的、生化学的アプローチにより SLFs 複合体の実体解明を、第 2 章では免疫組織化学的アプローチにより和合および不和合受粉時における花粉管内の S-RNase の挙動解析をおこなった。

第 1 章では、SLFs が形成すると予想されるユビキチンリガーゼ複合体 (SCF<sup>SLFs</sup>) の分子実体を明らかにするため、構成因子の 1 つ、Cullin1 (CUL1) の同定を試みた。初めに、*P. hybrida* の葯および花粉のトランスクリプトーム解析により、5 種類の CUL1 ホモログ (CUL1-P, G, B, C, E) を発見した。これらのうち CUL1-P のみが SLFs と同様の花粉発生過程特異的発現プロファイルを示すことを見出した。さらに、CUL1-P および CUL1-G を標的としたノックダウン実験を行い、CUL1-P の発現抑制が特異的に他家交配時の稔性低下をもたらすことを示し、CUL1-P の非自己 S-RNase の無毒化への関与を証明した。CUL1-P および CUL1-G の N 末端部位 (CUL1-P<sup>DN</sup>, CUL1-G<sup>DN</sup>) を高発現する形質転換花粉では、SLF を含む複合体に CUL1-P<sup>DN</sup> のみが取込まれることを示し、CUL1-P の SCF<sup>SLFs</sup> への取り込みが、花粉管内での各 CUL1s の量比にではなく、構成因子間の特異的相互作用に依存することを証明した。この特異的相互作用については、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 系においても確認し、CUL1-P を構成因子とする SCF<sup>SLFs</sup> 複合体が、S-RNase の無毒化に関わることを明らかにした。

第 2 章では、雌ずいを伸長中の和合および不和合花粉管内における S-RNase 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。花粉管先端域からの連続切片観察によって細胞内 S-RNase の分布を調べ、S-RNase は主に花粉管先端部の細胞質中に存在すること、非自己花粉管では受粉初期の段階からその量が有意に減少していることを発見した。この結果は、S-RNase が花粉管の先端部位において取り込まれ、非自己花粉管ではその場で速やかに分解されていることを示している。

以上のように、本論文はナス科植物の自家不和合性の花粉因子複合体の構成因子の一つを明らかにすると共に、雌ずい因子の無毒化機構に関して示唆的な手掛かりを与えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が、博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。