

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23113002

研究課題名（和文）交雑適合性に関わる遺伝子間の調和と軋轢の分子機構

研究課題名（英文）Molecular dissection of "correlative gene systems" in plant self-incompatibility

研究代表者

高山 誠司 (TAKAYAMA, Seiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70273836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 130,400,000 円

研究成果の概要（和文）：植物の自家不和合性における自他識別は、S遺伝子座上の多数のハプロタイプ（S1, S2, ---, Sn）によって制御されている。各々のSハプロタイプは、花粉因子と雌すい因子（雌雄S決定因子）の両者をコードしており、両因子のSハプロタイプ特異的な相互作用を介して自他識別が行われている。本研究では、自家不和合性に関わる以下の2つの「ゲノム・遺伝子相関」に焦点を絞り、詳細な分子機構とこれらが生まれてきた進化の道筋を明らかにした。(1) S決定因子対立遺伝子間の優劣性。(2) 雌雄S決定因子間の「自己」および「非自己」特異的な相互作用。

研究成果の概要（英文）：Self-incompatibility (SI) is an intraspecific reproductive barrier adopted by angiosperms that allows the pistil to distinguish between self and non-self pollen. In most species, the self/non-self recognition in SI is controlled by a large number of haplotypes (S1, S2, ---, Sn) at the S-locus. Each S-haplotype encodes both male-specificity and female specificity determinants (S-determinants), and the self/non-self discrimination is accomplished by the S-haplotype-specific interaction between these S-determinants. Therefore, the S-locus is an ideal target to study allelic and epistatic interactions. We focused on the following two types of "correlative gene system" involved in SI, and dissected their molecular mechanisms and their evolutionary histories. (1) Dominant-recessive interactions between S-determinant alleles. (2) Self- and nonself-specific interactions between male and female S-determinants.

研究分野：細胞間情報学

キーワード：遺伝学 遺伝子 ゲノム 植物 進化 エピジェネティクス 自家不和合性 優劣性

### 1. 研究開始当初の背景

有性生殖過程では、異種ゲノム間の相互作用を介して交配相手の選別が行われる。植物の自家不和合性は、*S* 遺伝子座上のハプロタイプ ( $S_1, S_2, \dots, S_n$ ) の異同を介して自己と非自己の花粉を識別し、自殖を回避する仕組みである。*S* 遺伝子座には、自他選別に当たる多型性の雌雄因子 (花粉因子と雌ずい因子) がコードされており、両者をコードする複対立遺伝子は密接に連鎖してハプロタイプとして遺伝するために、「ゲノム・遺伝子相関」研究の格好の標的となりうる。我々は、これまでに、アブラナ科やナス・バラ科などの植物種の雌雄因子の実体解明と相互作用解析を進めてきた。その過程で、(1) アブラナ科の花粉因子の対立遺伝子間の「優劣性」が、優性側対立遺伝子由来の miRNA による劣性側対立遺伝子のメチル化、発現抑制という形で制御されている事例を発見した。これは、「優劣性」という古典的な対立遺伝子間相互作用にエピジェネティクスが関与することを示した最初の例である。しかし、この優劣性制御の新たな分子機構が、アブラナ科の花粉因子対立遺伝子間のすべての優劣性制御に関与するものであるか、その他の優劣性現象にも関わる普遍的なものであるかは不明であった。また、(2) アブラナ科植物が同一 *S* ハプロタイプ上の雌雄因子間の相互作用を介して「自己」を認識してその受精を拒絶しているのに対し、ナス・バラ科植物では、異なる *S* ハプロタイプ上の雌雄因子間の相互作用を介して「非自己」を認識してその受精を促進していることを明らかにしてきた。しかも、後者では、多数の非自己の雌ずい因子を認識するために、花粉因子が「遺伝子重複」を起こし、免疫系に類似した協調的非自己認識機構を進化させていることを発見した。しかし、アブラナ科の「自己認識」機構、ナス科・バラ科の「非自己認識」機構共に分子機構の詳細は未解明であり、また、こうした自他識別機構が進化の過程でどのようにして生まれてくるのかは全くの謎であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物の自家不和合性に関する以下の2つの「ゲノム・遺伝子相関」現象を対象として、分子機構の詳細を明らかにすると共に、各々の機構の普遍性を検証し、こうした「ゲノム・遺伝子相関」が生まれてくる進化の道筋を明らかにすることを目的とした。

- (1) 対立遺伝子間におけるエピジェネティックな優劣性発現制御
- (2) 雌雄因子間の相互作用を介した「自己認識」および「非自己認識」

### 3. 研究の方法

- (1) 対立遺伝子間におけるエピジェネティックな優劣性発現制御  
アブラナ科植物 *Brassica rapa* の花粉因子対

立遺伝子は、一般に優性を示す class-I (e.g.  $S_8, S_9, S_{12}, S_{52}$ ) と class-I に対して劣性を示す class-II (e.g.  $S_{44}, S_{60}, S_{40}, S_{29}$ ) に分類される。また、class-I 同士では一般に共優性を示すのに対し、class-II 同士ではお互いに優劣性関係を示す場合が多く、 $(S_8 = S_9 = S_{12}) > (S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29})$  といった複雑な優劣性関係が認められる。申請者は、class-I と class-II 間の優劣性が *Smi* と名付けた 24 塩基の miRNA を介してエピジェネティックに制御されていることを見出したが、class-II 間の直線的な優劣性関係の仕組みは謎であった。本研究では、class-II 間の優劣性制御の仕組みを明らかにすることを第一目標とした。さらに、他のアブラナ科植物の花粉因子対立遺伝子間の優劣性制御にも類似の機構が普遍的に進化しているかを検証することを第二目標とした。さらに、他の異なる優劣性現象に類似のエピジェネティックな制御機構が含まれている可能性を検証することを第三の目標とした。

- (2) 雌雄因子間の相互作用を介した「自己認識」および「非自己認識」

アブラナ科の雌ずいは SRK と名付けた受容体キナーゼを持ち、花粉は SP11 と名付けた (SRK に対する) リガンドを持つ。同一 *S* ハプロタイプ上の SP11 が SRK に特異的に結合することを利用して受粉の際に「自己」を認識し、その花粉を「排除」する不和合性反応を誘導する。一方、ナス科の雌ずいは、細胞毒として機能するリボヌクレアーゼの S-RNase を持ち、花粉は SLFs と名付けた (S-RNase の解毒に関わる) F-box 蛋白質群を持つ。非自己の花粉管が雌ずいを伸長する際に、花粉管内に侵入してきた S-RNase を異なる *S* ハプロタイプにコードされた「非自己」の SLFs が認識し、解毒することで、その花粉が選択的に「受容」される。以上が、本研究開始時に我々が提唱していた「自己認識」および「非自己認識」機構の概要であるが、機構の詳細は未解明であり、特に「非自己認識」システムにおいてはいくつの SLFs が認識に関与しているのかさえ不明の状態であった。そこで、本研究では、「自己認識」および「非自己認識」機構の詳細を明らかにすることを第一目標とした。さらに、花粉因子と雌ずい因子のゲノム情報を網羅的に解析することで、こうした自己認識」および「非自己認識」機構が発生してきた進化の道筋に関して新たなモデルを提唱することを第二の目標とした。

### 4. 研究成果

- (1) 対立遺伝子間におけるエピジェネティックな優劣性発現制御

アブラナ科植物 *Brassica rapa* の class-II *S* ハプロタイプ間の直線的な優劣性発現制御機構を解明するために、4 つの class-II *S* ハプロタイプ ( $S_{44}, S_{60}, S_{40}, S_{29}$ ) のゲノム配列と薬で作られる低分子 RNA を解析した。その結果、これらの class-II *S* ハプロタイプに特異的

な逆位反復配列を見つけ、そこから *Smi* とは異なる新たな 24 塩基の miRNA (*Smi2* と命名) が葯において産生されていることを発見した。また、*Smi2* は *S* ハプロタイプ間で塩基置換による多型性を示し、優性側の *S* ハプロタイプから産生される *Smi2* は、劣性側 *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーター領域と高い相同性を示すことが示された。さらに形質転換実験により *Smi2* のゲノム領域を導入すると、劣性側 *S* ハプロタイプの *SP11* プロモーター領域が DNA メチル化修飾を受け、その発現が抑制されることが示された。以上の結果から、*Smi2* が class-II *S* ハプロタイプの優劣性を制御する miRNA であり、*B. rapa* における花粉因子対立遺伝子間の複雑な優劣性関係 ( $S_8 = S_9 = S_{12}$ ) > ( $S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$ ) が、すべて *Smi* と *Smi2* という 2 種類の miRNA を介するエピジェネティックな制御で説明しうることが明らかとなった (Tarutani & Takayama, Curr. Opin. Plant Biol., 2011; Yasuda *et al.*, 論文投稿中)。

次に、このエピジェネティックな優劣性制御の普遍性を確認するために *Arabidopsis lyrata* の花粉因子複対立遺伝子間の優劣性 ( $S_{20} = S_{39}$ ) > ( $S_{13} = S_{16}$ ) >  $S_{14} > S_1$  についても解析を進め、*B. rapa* の場合と同様に、3 種類の miRNA で制御されている可能性を明らかにした(投稿準備中)。なお、*Arabidopsis halleri* の優劣性 ( $S_{13} = S_{20}$ ) >  $S_{12} > S_4 > S_3 > S_1$  においても多数の miRNA が関与している可能性がフランスのグループより報告された (Durand *et al.*, Science, 346, 1200, 2014)。こうした多段階の優劣性関係の制御に必要な miRNA の種類に関しては我々のデータと合致せず、更なる精査が必要であるが、エピジェネティックな優劣性制御機構がアブラナ科の花粉因子複対立遺伝子間で普遍的に機能していることが明らかになった。

さらに、従来 dominant negative 変異として扱われていたものの中に、エピジェネティックな発現制御が関与する例を見出した(投稿準備中)。今後、類似のエピジェネティックな発現制御機構が、他の優劣性現象の制御にも関わっている例が複数見出されてくると期待される。

## (2) 雌雄因子間の相互作用を介した「自己認識」および「非自己認識」

アブラナ科植物の自家受粉時には、同一 *S* ハプロタイプ上にコードされた花粉因子 *SP11* が、雌ずい因子 *SRK* と相互作用することで雌ずい乳頭細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が誘起され、花粉への小胞輸送が阻害されることで、「自己」の花粉の吸水・発芽が阻止されることが明らかとなった (Iwano *et al.*, Plant Cell, 2014; Nature Plants, 2015)。一方、ナス科植物では、雌ずい因子 *S-RNase* に対し、異なる *S* ハプロタイプ上の特定の花粉因子 *SLF* の *SCF* 複合体 (*SCF<sup>SLFs</sup>*) が *in vitro* で直接結合しポリリコピキチン化することが示され (Entani *et*

*al.*, Plant J., 2014)、「非自己」を認識していることが生化学的に証明された。これら研究により、植物の自家不和合性が「自己認識」と「非自己認識」に分類できることが明らかになった (Iwano & Takayama, Curr. Opin. Plant Biol., 2012)。さらに、ナス科植物の「非自己認識」機構については、次世代シーケンサーを使い、*Petunia* の 8 つの不和合性 *S* ハプロタイプ ( $S_5, S_7, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{17}, S_{19}, S_{22}$ ) と 2 つの和合性 *S* ハプロタイプ ( $S_m, S_{0m}$ ) にコードされた *SLFs* を網羅的に抽出し、本植物の自家不和合性が 18 種類の *SLFs* による協調的な非自己 *S-RNase* 認識・無毒化機構により制御されていることを明らかにした (Kubo *et al.*, Nature Plants, 2015)。さらに、*SLFs* の塩基配列の詳細な解析から、*S* ハプロタイプ間で gene conversion 等による *SLFs* の受け渡しが行われており、不和合性 *S* ハプロタイプは「自己」を認識する *SLFs* を獲得しない形で進化していること、逆に「自己」を認識する *SLFs* を獲得することで自家和合性に变化した *S* ハプロタイプが複数存在することも明らかになった。

こうした進化背景を反映して、アブラナ科植物における花粉因子 *SP11* と雌ずい因子 *SRK* は、密接に連鎖する形で長い時間をかけて共進化してきており、両因子の進化系統樹は Balancing selection 型の長い枝を持つ鏡像型を示すのに対し、ナス科植物では花粉因子 *SLFs* と雌ずい因子 *S-RNase* がさらに長時間かけて共進化しているものの、花粉因子 *SLFs* の系統樹は短い枝を持つ Selective sweep 型を示すことが示された。以上の結果をもとに、植物自家不和合性における「自己認識」機構と「非自己認識」機構の進化モデルを考察して報告した (Fujii *et al.*, Nature Plants, 2016)。また、当該モデルに基づき進化過程を計算機上で模擬したところ、gene conversion を想定した場合のみ、新たな *S-RNase* をコードする *S* ハプロタイプが、これを認識する新たな *SLFs* の誕生に追従する形で進化してくることが示され、モデルの妥当性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

Fujii S, Kubo K-i, Takayama S. Non-self and self-recognition models in plant self-incompatibility. Nature Plants 2, 2016, 査読有, 印刷中.

Iwano M, Ito K, Fujii S, Kakita M, Asano-Shimosato H, Igarashi M, Kaothien-Nakayama P, Entani T, Kanatani A, Takehisa M, Tanaka M, Komatsu K, Shiba H, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A, Takayama S. Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. Nature Plants 1, 15128, 2015,

査読有, DOI: 10.1038/nplants.2015.128.

Kubo K, Paape T, Hatakeyama M, Entani T, Takara A, Kajihara K, Tsukahara M, Shimizu-Inatsugi R, Shimizu KK, Takayama S. Gene duplication and genetic exchange drive the evolution of S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Nature Plants* 1, 14005, 2015, 査読有, DOI: 10.1038/nplants.2014.5.

Entani T, Kubo K, Isogai S, Fukao Y, Shirakawa M, Isogai A, Takayama S. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of S-RNase in a solanaceous cross-compatibility reaction. *Plant J*. 78,1014-1021, 2014, 査読有, DOI: 10.1111/tj.12528.

Lao X, Suwabe K, Niikura S, Kakita M, Iwano M, Takayama S. Physiological and genetic analysis of CO<sub>2</sub>-induced breakdown of self-incompatibility in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.* 65, 939-951, 2014, 査読有, DOI: 10.1093/jxb/ert438.

Iwano M, Igarashi M, Tarutani Y, Kaothien-Nakayama P, Nakayama H, Moriyama H, Yakabe R, Entani T, Shimosato-Asano H, Ueki M, Tamiya G, Takayama S. A pollen coat-inducible autoinhibited Ca<sup>2+</sup>-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell* 26, 636-649, 2014, 査読有, DOI: 10.1105/tpc.113.121350.

Iwano M, Ngo QA, Entani T, Shiba H, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A, Grossniklaus U, Takayama S. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells. *Development* 139, 4202-4209, 2012, 査読有, DOI: 10.1242/dev.081208.

Iwano M, Takayama S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 78-83, 2012, 査読有, DOI: 10.1016/j.pbi.2011.09.003.

Shiba H, Takayama S. Epigenetic regulation of monoallelic gene expression. *Develop. Growth Differ.* 54,120-128, 2012, 査読有, DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01317.x.

Ikeda Y, Kinoshita Y, Susaki D, Ikeda Y, Iwano M, Takayama S, Higashiyama T, Kakutani T, Kinoshita T. HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 21, 589-596, 2011, 査読有, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.013.

Tarutani Y, Takayama S. Monoallelic gene expression and its mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 608-613, 2011, 査読有, DOI: 10.1016/j.pbi.2011.07.001.

[学会発表](計 39 件)

和田七夕子, 高山誠司. アブラナ科植物において低分子 RNA とその標的配列の多様性により複雑な階層的優劣性が制御される. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 (BMB2015) ワークショップ, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

高山誠司. 自家不和合性の分子機構. 国立遺伝学研究所研究会「植物の生殖成長期の発生を制御する分子機構」, 2015 年 11 月 7 日, 遺伝学研究所 (静岡県・三島市)

Takayama S. Allelic variants of small RNA control dominance hierarchy among self-incompatibility alleles in *Brassica rapa*. International Symposium "Establishing Next-Generation Genes", 2015 年 5 月 28 日, 奈良春日野国際フォーラム薨 (奈良県・奈良市)

Tsukahara M, Takayama S. Molecular mechanism for S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. International Symposium "Signaling and Coordination in Plant Development", 2013 年 11 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

Ito K, Takayama S. Analysis of intracellular signaling pathway in *Brassica* self-incompatibility. International Symposium "Signaling and Coordination in Plant Development", 2013 年 11 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

高山誠司. 自家不和合性の優劣性を制御する低分子 RNA, 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ, 2012 年 12 月 11 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

Entani T, Takayama S. Ubiquitin-proteasome system-mediated self/non-self discrimination in solanaceous self-incompatibility, NAIST International Symposium "A New Generation of Plant Embryo Research", 2012 年 10 月 29 日, NAIST (奈良県・生駒市)

Takayama S. Noncoding RNA and epigenetics in self, non-self recognition in fertilization. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Nuclear Events in Plant Gene Expression and Signaling", 2012 年 3 月 10 日, Taos (USA)

Iwano M, Takayama S. Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae. 22nd International Congress on Sexual Plant Reproduction, 2012 年 2 月 14 日, Melbourne (Australia)

Shiba H, Takayama S. Epigenetic regulation of dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility alleles. 第 34 回日本分子生物学会ワークショップ, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Kubo K, Takayama S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based

self-incompatibility. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference, 2011年11月29日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計2件)

Iwano M, Ito K, Shimosato-Asano H, Lai K-S, Takayama S. Self-Incompatibility in the Brassicaceae, “Sexual Reproduction in Animals and Plants”, Eds. Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, pp.245-254, 2014, DOI: 10.1007/978-4-431-54589-7\_21.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

新学術領域研究ホームページ

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/prg/genetics/>

大学ホームページ

<http://bsw3.naist.jp/takayama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山誠司 (TAKAYAMA Seiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70273836

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

東山哲也 (HIGASHIYAMA Tetsuya)

名古屋大学・理学研究科 (WPI)・教授

研究者番号：00313205