

花粉劣性を示すアブラナ類の花粉側S決定因子のポストゲノム解析 (アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子群の多様性の分子機構)

●柴 博史

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

〈研究の目的と進め方〉

2000-2001年度

自家不和合性は植物が持つ自家受精を抑制する機構の一つである。本機構は同一染色体上に位置する複対立遺伝子Sで説明され、雌しべと花粉に存在する自己・非自己を識別する認識物質のS遺伝子型が一致した場合に不和合となる。最近、アブラナ類ではS遺伝子として雌しべ側のSLG (S-locus glycoprotein), SRK (S-receptor kinase) と花粉側のSP11/SCR (S-locus protein 11 or S-locus cysteine rich) が明らかになったが、これらはS系統間で非同義置換を伴う高度な多型を示す。またアブラナ類のS系統は集団中に100程度存在するといわれており、このような多数の対立遺伝子で構成される図式は免疫系に関わるMHC遺伝子座に匹敵する。申請者はS遺伝子座の多型形成のメカニズムを解明することを目的に、SLG, SRK, SP11遺伝子の周辺領域を含むS遺伝子座75kbを解析し、遺伝子内組換えまたは遺伝子変換に関わる様々な情報の収集を試みた。また他のS遺伝子座と詳細な比較を行い、上記メカニズムへの寄与が予想されるゲノム構造上の特徴についても考察した。さらに S遺伝子の多型形成機構を明らかにするため、比較的S遺伝子が保存されている複数の花粉劣性系統のS遺伝子座の解析と系統間におけるS遺伝子座の比較を計画した。

2002年度

高等植物は、受粉の際、雌ずいと花粉の間で自他の認識反応がおき、自己の花粉の伸長が抑制されて、他個体の花粉とのみ受精が可能となるものが多い。この現象は自家不和合性と呼ばれ、近親交雑を抑制する機構と考えられている。本システムはS遺伝子座上に連鎖して存在する一連の複対立遺伝子群 (S1, S2, …, Snハプロタイプ) で制御されており、雌ずい、花粉双方のS遺伝子型が一致した場合に不和合となる。アブラナ類の場合、100以上ものSハプロタイプが存在すると言われているが、その中には2つのハプロタイプ間で優劣の関係が生じる場合がある。昨年度、本研究課題の一環として進めてきた花粉劣性系統のS遺伝子座の解析から従来得られていたSP11の配列とは由来の異なるタイプのSP11を見出し (劣性SP11)、当該配列が優性を示すSハプロタイプとのヘテロ体でその発現が抑制され、その結果、優劣性が決まることを明らかにした。しかし優性/劣性ヘテロ体の時、どのようにして劣性SP11の発現が抑制されるのかは不明であった。本研究では劣性SP11の発現抑制機構が1) 転写因子のアフィニティー等に起因する拮抗的なものかどうか、2) DNAメチル化等のゲノムの構造変化を伴うものであるかどうかの2点に絞って解析を進めた。

〈研究開始時の研究計画〉

2000年度

既に得ていたアブラナ類B. rapa S12系統のSRK, SP11遺伝子を含むBACクロンの解析と和合株または他の自家不和合系統のゲノムライブラリーを作製する。また次年度は上記ゲノムライブラリーからS遺伝子座を含むクロ

ーンをスクリーニングし、シーケンスを行う。またシロイヌナズナのゲノムシーケンスが公表され次第、BACクロンのシーケンスまたは既に得られている他のB. rapa 1系統のゲノム解析の結果と詳細な比較を行う。2001年度

和合変異株B. rapa Yellow sarson C634株と劣性株B. rapa 2系統のゲノムDNAを単離し、フェージまたはコスミドライブラリーを作製する。ライブラリーが作製出来次第SLG, SRK, SP11遺伝子をプローブにしてS遺伝子座100kb程度をカバーする複数のゲノム断片をスクリーニングする。当該クロンをショットガンシーケンスし、S遺伝子座を明らかにする。劣性株に関しては花粉S決定因子SP11が明らかでないのでSLG-SRK遺伝子間およびその周辺領域の解析により予測されたORFの発現パターンを調べ、劣性のSP11の特定を進める。得られたS遺伝子座の相互比較を行い、S遺伝子座の多様性形成のメカニズムにつながる種々の遺伝情報を収集する (各遺伝子間の距離や配置、遺伝子重複、トランスポソンの存在の有無等)。

2002年度

劣性ホモあるいは優性/劣性ヘテロ体の葯組織からゲノムDNAを抽出し、劣性SP11プロモーター領域のメチル化の有無をbisulfite法またはメチル化sensitiveな制限酵素を用いて明らかにする。また複数の劣性SP11プロモーター領域を単離してモチーフ配列を探索する。また得られた劣性SP11プロモーター領域と優性系統SP11プロモーターを比較する。さらに優性SP11プロモーターに劣性SP11をつなげたコンストラクトあるいは劣性SP11プロモーターに優性SP11をつなげたコンストラクトを作成し、アブラナ科植物に導入して花粉における優劣性の変化を調べる。

〈研究期間の成果〉

2000年度

アブラナ類B. rapa S12系統株のS遺伝子座を含む約75kbのBACクロンを解析したところ、SLG-SP11間とSRKの下流20kb付近に転位性遺伝因子がクラスターで存在していた。また既に報告されている他3系統のS遺伝子座と比較したところ、S遺伝子は系統間で遺伝子間の距離、転写方向等、非常に多様であったが、周辺のORFは保存されていた(図1)。さらにS12系統のS遺伝子座を含む約75kbとS9系統のS遺伝子座を含む約76kb間でハプロタイプ解析を行ったところ、SLGの上流約10kbからSRKの下流約20kbの非コード領域はほとんど一致しなかった。またS遺伝子座内には複数の反復配列が確認され、その中には両系統で保存された約500bpの回文構造をした反復配列も見られた。(文献リスト1, 2)

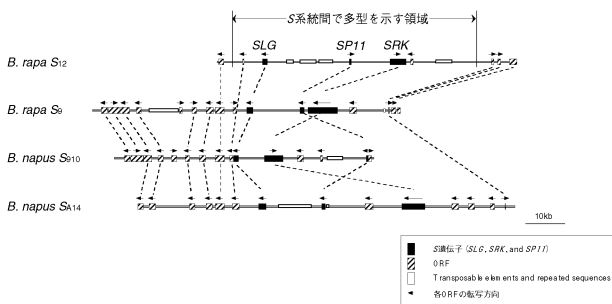


図1 S遺伝子座の構造

2001年度

S遺伝子の多型形成機構をさらに詳細に明らかにするため、系統間で比較的S遺伝子 (SRKとSLG) の塩基配列が保存されている花粉劣性系統のS遺伝子座の解析と系統間におけるS遺伝子座の比較を計画した。本年度は、まず花粉劣性を示す1系統のS遺伝子座を解析し、未だ明らかでない花粉劣性系統の花粉因子SP11 (劣性SP11) の探索を行った。花粉劣性を示すBrassica rapa S60ホモ系統株のファージゲノムライブラリーから、SRKを含むクローンを単離し、このクローンを起点にしてゲノムウォーキングを行ったところ、SRKの上流6.5kbにSP11と同様に複数のシステイン残基をコードしていると予想されるゲノム領域を見出した。当該配列を基にプライマーを製作し、薬cDNAを用いたRT-PCRを行ったところ、その発現が認められたため、これをS60-SP11とした。S60-SP11は発現タンパク質を用いた受粉実験の結果からS遺伝子特異的に不和合反応を誘起したため、花粉優性系統のSP11 (優性SP11) の対立遺伝子と断定した。S60-SP11を基に他の5つの花粉劣性系統株からSP11を単離したところ、系統間の相同性は優性SP11間の相同性と比較して高かった (アミノ酸配列レベルで61-91%,花粉優性系統間では38-45%)。また優性SP11とはアミノ酸配列レベルで25-31%の相同性しかなかったことから優性SP11と劣性SP11は極早い時期に分化したものと推察される。さらに優性/劣性ヘテロ体では劣性SP11の発現が抑制されていたことから花粉劣性の形質が劣性SP11の転写レベルでの発現抑制によって決まることを明らかにした (図2)。(文献リスト2,3)

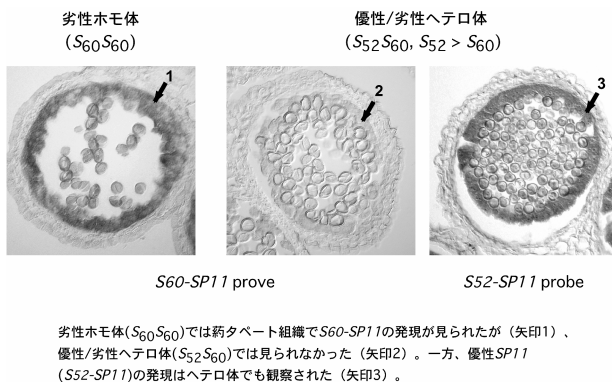


図2 葯タペト細胞における劣性SP11の発現 (in situ hybridization)

2002年度

劣性SP11の転写抑制がDNAメチル化等のゲノムの構造変化を伴うものであるかどうか調べるため、劣性ホモあるいは優性/劣性ヘテロ体の葉、花弁、柱頭、成熟花粉および葯組織からゲノムDNAを抽出し、劣性SP11の5'プロモーター領域および構造遺伝子領域のメチル化の有

無をbisulfite法を用いて調べた。その結果、劣性ホモあるいは優性/劣性ヘテロの各組織におけるCpGメチル化は観察されなかった。しかし局所的なメチル化の可能性も考えられるため、現在、SP11の発現がみられる葯タペト組織のみを回収して同様の実験を進めている。またプロモーター配列の違いが転写因子等の結合に影響を与え、優性/劣性ヘテロ体では拮抗的に劣性系統のSP11プロモーター領域の発現が抑制されている可能性が考えられたため、劣性5系統からSP11遺伝子のプロモーター領域を単離して比較した。その結果、開始コドン上流約200bpでは80~90%と高い相同性を示し、配列中には葯特異的なモチーフ配列も見出されたが、優性系統のSP11のプロモーター配列との相同性は認められなかった。またレポーター遺伝子を用いたトランジェントアッセイを行い、開始コドン上流約500bpのプロモーター配列が発現様式を決定する領域であることを明らかにした。今後、発現抑制に関わる領域の絞り込みに着手する予定である。

<考察>

2000-2001年度 (S遺伝子座の多様性の分子機構解明に関して) S12系統間で多型を示す領域はS遺伝子とその周辺約20kb内に限定されると考えられる。またこの領域は転位性遺伝因子がクラスターを形成していることからゲノム配列中に組み込まれやすい領域があると考えられる。また花粉劣性系統は系統間で比較的S遺伝子 (SRKとSLG) の塩基配列が保存されていることから、劣性系統の遺伝子座も同様に解析したところ、SLG,SRKと同様にSP11の塩基配列も比較的保存されていたが、SRKとSP11間の intergenic領域の相同性はほとんど無かった。S遺伝子座内には複数の反復配列が確認され、その中には両系統で保存された約500bpの回文構造をした反復配列も見られた。S遺伝子座の多型は単なる点変異の蓄積にとどまらないダイナミックなDNA配列の挙動に因ると考えられるが、これらの事象はS遺伝子座の多型形成に遺伝子座内での転位・組換えが関与している可能性を示唆していると考えられる。

2001-2002年度 (花粉の優劣性機構解明に関して)

本研究から劣性系統のSP11は/劣性ヘテロ体になると転写レベルで抑制される事が明らかとなった。上記発現抑制はその後の解析からヘテロ体を形成する2つのS系統間の優劣の関係で決まり、常に劣性側のSP11の発現が抑制されること、また次世代で優劣の関係が消失すると発現は回復する事が明らかとなっている。このようなエピジェネティックな発現抑制機構として劣性SP11特異的なDNAメチル化が想定されたが、今のところ劣性ホモ体と優性/劣性ヘテロ体間におけるCpGメチル化の違いは観察されていない。しかし動物では組織・発達段階特異的なDNAメチル化が発生、分化等に関わっていることから植物でも同様に局所的なDNAのメチル化が起こっている可能性が考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

S遺伝子座はMHC遺伝子と同様、進化速度が速く、高度な多型を示す一方で、S遺伝子座内では対立遺伝子間の組換えが抑制されているなど、分子進化を研究する上で格好の研究対象である。また我々の扱っているアブラナ科植物では約100ものS遺伝子座が存在すると想定されており、分子進化を研究する上で大変有用であると思われる。本研究では、S遺伝子座の周辺に転位性遺伝因子がクラスターを形成していること、回文構造状の反復配

列を含めて複数の反復配列の存在を明らかにしているが、これらはゲノム構造の進化または多様性の維持、自己・非自己の認識システムの構築に関する新たな知見を与えるものと考えられる。

劣性のSP11は我々が最近明らかにし、プロモーター配列、あるいは発現様式に関しても全て明らかにしており、本研究をリードする立場にある。また複数の対立遺伝子間で優劣性の関係があり、優性のアレルが劣性のアレルの発現を転写レベルで抑制することで優劣が決定するという事象は動物、植物を問わずこれまでほとんど例が無く独創的である。本研究課題終了後、申請者は優性/劣性ヘテロ株における劣性SP11の発現抑制が、葯タペート組織特異的な劣性SP11プロモーター領域の*de novo*メチル化によることを明らかにした。メンデルの発見した遺伝法則の一つである対立遺伝子間の優劣性は広く生物一般に見られる現象であり、従来その多くは劣性の形質が遺伝子レベルの欠陥等に起因したものと考えられていた。今回の発見は優劣性に関する知見に新たなモデルを提唱するものであり、特に複対立遺伝子間での優劣性を考える上で大いに貢献すると考えている。またエピジェネティックな遺伝子発現制御は生物の発生や分化、発癌などに関わっていることが示されており、ポストゲノム研究の重要な位置を占めている。本研究で得られた成果は自家不和合性の優劣性のメカニズムの解明に貢献するばかりでなく、広く遺伝子発現調節機構の研究に寄与すると考えている。さらに植物では一般的にメチル化パターンは世代を超えても変わらないと考えられており、これまでDNAメチル化の消失が胚乳細胞で起こっているのが唯一報告されているに過ぎなかった。しかし本研究成果は植物にも時期・組織特異的なゲノムDNAの*de novo*メチル化があることを示すものであり、エピジェネティックな遺伝子発現制御が予想される種々の現象の機構解明にも大いに貢献すると考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

2000年度

当該研究で扱う*Brassica rapa*のS遺伝子座とその近縁種である和合種の*Arabidopsis thaliana*のゲノムDNAを比較したが、*Arabidopsis*ゲノム内におけるS遺伝子座の転位や欠失が大きすぎてS遺伝子の多型形成機構の解明には利用出来なかった。

2001年度

S遺伝子座近傍にSRK様配列がクラスターを形成していたため、SRKを含むゲノムクローンの単離に予想以上に多くの時間と労力を要した。そのため和合株を含む複数の劣性系統のS遺伝子座の解析が出来なかった。

2002年度

ゲノムDNAのメチル化を調べるため、葯からタペート組織を回収したが、材料の確保、単離方法の確立に多くの時間と労力を費やした。また自家不和合性を示すアブラナ科植物の形質転換が困難なこと、生育に半年近くかかる点が本研究の律速となっている。

〈今後の課題〉

2000年度

S遺伝子の多型形成機構の解明には、比較的S遺伝子が保存されているS系統間の比較が必要であると考えられた。そこで複数の花粉劣性系統のS遺伝子座の解析と系統間におけるS遺伝子座の比較を行う。

2001年度

複数の劣性系統のS遺伝子座の解析と他の優性を示す

*Brassica*のS遺伝子座と比較する。また本研究で得られた劣性系統のSP11の転写レベルでの抑制機構の解明を進める。

2002年度

葯タペート組織のメチル化の有無が明らかにすれば劣性SP11の発現抑制機構の一層の絞り込みが出来ると考えている。またSP11プロモーター領域に結合する転写因子の探索も試みる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1)論文

1. 0111201012

Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., Che, F.-S., Suzuki, G., Watanabe, M., Hinata, K., Isogai, A., A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica*, *Plant Physiol.*, 125, 2095-2103 (2001).

2. 0203131533

Shiba, H., Kenmochi, M., Sugihara, M., Iwano, M., Kawasaki, S., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., Genomic organization of the S locus region of the *Brassica*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67, 622-626 (2003).

3. 0303111323

Shiba, H., Iwano, M., Enatni, T., Ishimoto, K., Shimosato, H., Che, F.-S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica* Pollen Is Regulated at the RNA Level, *Plant cell*, 14, 491-504 (2002).