

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座		
氏 名	円谷 徹之	提 出	平成12年1月6日
題 目	ナス科植物 <i>Petunia hybrida</i> の自家不和合性遺伝子の解析		
要旨 自家不和合性は、顕花植物において、花粉、花柱共に正常で稔性を保っているにも関わらず、自家受粉によっては受精が起こらず、種子を形成しない現象である。多くの植物の自家不和合性は、多数の複対立遺伝子（S遺伝子）を持つ単一の自家不和合性遺伝子座（S遺伝子座）によって制御されている。自家不和合性ナス科植物では、花柱側の自家不和合性関与物質は、S遺伝子に対応するRNase活性を持つ分泌型糖タンパク質、S-RNaseであることが証明されているが、花粉側自家不和合性関与物質は未だ同定されていない。花粉側自家不和合性遺伝子は、S-RNase遺伝子との間で組み換えが起こらないことから、ゲノムDNA上のS-RNase遺伝子近傍に存在すると考えられている。本研究では、花粉側自家不和合性遺伝子を同定する目的で、ナス科植物<i>Petunia hybrida</i>のS-RNase遺伝子を含むゲノムDNA断片のクローニングと解析を行った。 まず、材料の選定を行った。奈良先端科学技術大学院大学敷地内に野生化したと思われる<i>P. hybrida</i>が生えていたので、8個体を採取し、自家不和合性と交雑性の検定を行った。その結果、8個体中、自家不和合性個体が5個体、自家和合性個体が3個体であり、自家不和合性個体のうち2個体は同じS遺伝子型を持ち、その他は相互に異なるS遺伝子型であると考えられた。 2つの自家不和合性個体（B、D個体）から4つのS-RNaseを精製し、これらをコードする完全長cDNAの構造を決定した。これらのS-RNaseはこれまでに報告されているS-RNaseに相同であったが、完全に配列が一致するものはなかった。このことから、今回同定したS-RNaseは新規のものであると判断し、B個体由来のものをSB1-、SB2-RNase、D個体由来のものをSD1-、SD2-RNaseと名付けた。 自家和合性個体のうち、B個体と同じ組み合わせのS-RNaseを持つF個体が存在した。これらの個体の相互交雑試験から、F個体の自家和合性は、花粉側自家不和合性表現形が消失したことによるものであることが判明した。自家不和合性個体を人為的に染色体倍化したものや、自家不和合性個体に近縁の4倍性種は、しばしば自家和合性を示すことが報告されているので、F個体の倍数性を調査したところ、これが4倍体であることが判明した。そこで、B個体（SB1SB2遺伝子型）とそれに由来するホモS遺伝子型個体（SB1SB1遺伝子型）をそれぞれ染色体倍化して得られた個体の自家不和合性表現型を調べた。その結果、Bの倍化個体（SB1SB1SB2SB2遺伝子型）の花粉は、同じS遺伝子型の花柱に対して和合性を示し、F個体個体と同じ表現型であったのに対し、SB1SB1の倍化個体（SB1SB1SB1SB1）は同じS遺伝子型の花柱に対して不和合性を保持したままであった。このことから、染色体倍化が自家不和合性の消失につながるのは、Sヘテロ遺			

伝子型個体に限られることが示唆された。Sヘテロ 4 倍体とSホモ 4 倍体の花粉の質的な違いを考えると、前者はSヘテロ 2 倍性花粉を含むであろうのに対し、後者はSホモ 2 倍性花粉のみであると考えられることである。Sヘテロ 2 倍性花粉が同じS遺伝子型の花柱に対して自家和合性を示すと示唆されることから、花粉側S遺伝子産物が、異なるS遺伝子型のS-RNaseのRNase活性を阻害するS-RNase inhibitorである可能性を考察した。

S遺伝子座のクローニングに向けて、まず、S遺伝子座の染色体上でのマッピングを行った。SB1-RNase遺伝子をプローブとして用いて染色体蛍光*in situ* hybridization (FISH)を行ったところ、第3染色体のセントロメア付近にハイブリダイズした。このことから、S遺伝子座が第3染色体のセントロメア付近に存在することが明らかとなった。しかし、この部分を物理的に単離することは、染色体の大きさから考えて困難であると考えられた。

そこで次に、λゲノミックライブラリーを作製して、SB1-RNase遺伝子を含むクローンを得た。3個の陽性クローンが得られ、これらによってカバーされる領域は33 kbpとなり、これまでに報告されているS-RNaseを含むクローンの中では、最も広い領域をカバーしていると考えられた。この領域の中には、多数の反復配列と予測オープンリーディングフレーム (ORF) が含まれていた。この領域をプローブとして花粉管cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、4つのcDNAクローンが得られた。しかしながら、これらのクローンの配列は、それに対応するゲノム領域と相同性を示すものの、同一の配列ではなかった。このことから、これらの領域が多重遺伝子族に属することが示唆された。

ORF予測によって高い可能性を持って抽出され、得られたcDNAクローンのうち2つと相同性を示すGF3とその周辺に存在する反復配列311rep2は、花粉管由来の8.0 kbと9.1 kbのRNAにハイブリダイズした。このことから、この領域が花粉管で発現する可能性が考えられた。また、GF3はゲノム中に少なくとも数10コピー存在することが明らかとなった。しかし、これらの多重遺伝子属のほとんどは、S遺伝子特異性はないものと思われた。

SB1-RNase遺伝子下流約20 kbpを占めるλ SB1-311をプローブとして染色体FISHを行うと、セントロメアに強くハイブリダイズした。このことから、このクローン中に、セントロメア特異的配列が含まれるものと思われた。また、*P. hybrida*以外の*Petunia*属植物である*P. littoralis*のセントロメアにもこのクローンは強くハイブリダイズするのに対し、同じナス科の*S. sanitowongsei*、*N. tabacum*のセントロメアにはハイブリダイズしなかった。このことから、この領域に存在するセントロメア特異的配列は、*Petunia*属に特異的である可能性がある。

この領域の5つの反復配列のうち2つ (311rep1, 311rep2) がセントロメアにハイブリダイズした。また、多重遺伝子族を形成すると考えられたORFであるGF3もセントロメアにハイブリダイズした。この結果は、S遺伝子座がセントロメア付近に存在するという結論を追認するものであろう。また、GF3-311rep2領域が発現する可能性を持ち、セントロメアに局在するという、またその構造的特徴から、この領域がレトロエレメントに由来する可能性が考えられた。もしこの配列が花粉側自家不和合性遺伝子であるとする、これは、レトロエレメントから進化したものであるのかもしれない。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 円谷徹之

多くの高等植物は、自殖弱勢を防ぎ、種の遺伝的多様性を維持するための機構として、自家不和合性という性質を有している。自家不和合性においては、雌蕊と花粉の間で自己と非自己の認識というきわめて興味深い現象がある。この認識反応の分子機構については、近年いろいろな植物種での研究が進んでいる。申請者の円谷徹之は、材料としてナス科植物のペチュニアを選び、この分子機構の解析のための研究を行った。本論文は、これらの研究の成果をまとめたものであり、序論及び3章からなる。

申請者はまず、序論において、高等植物における自家不和合性の意義、その種類、S遺伝子の概念、および現在までの研究の流れとその成果について概説し、本論文で扱っているペチュニアの位置づけを述べている。すなわち、ペチュニアが、配偶体型自家不和合性を示し、その自他識別機構には、雌蕊側因子としてS-RNaseが関与していること、これに対応する花粉因子が未解明であることを述べ、本研究がこの花粉因子の解明を最終的な目的としたものであることを示した。

第1章では、申請者はまず、本研究のための材料として、本学キャンパスに自生するペチュニア(*Petunia hybrida*)を採取し、その相互交配、S-RNaseの精製、構造解析によって、S遺伝子型の異なる自家不和合性株4株及び、自家和合性株3株を確立した。また、自家不和合性株2株について、それぞれのS-RNaseをコードするcDNAの完全長塩基配列を明らかにし、本研究の基礎を確立した。

第2章では、第1章で得られた自家和合性株のうち1株が花粉側の形質の変異によって自家和合となっていることを、交配実験、およびS-RNaseの分析によって明らかにし、さらにその株が4倍体であり、通常の2倍体の植物では花粉は1つのS遺伝子しか持たないのに対し、4倍体の本植物では花粉が異なる2つのS遺伝子をもつことがその表現型の変異の原因であることを明らかにした。配偶体型植物の自家不和合性での花粉因子の性質についてはこれまで、レセプター説とインヒビター説があったが、本研究の結果は後者の説が妥当であることを強く支持し、今後の花粉因子の探索や、その機能についての生化学的な研究の方向性を示唆した。

第3章ではまず*S-RNase*のcDNAを用いてFISHを行い、S遺伝子座が第3染色体のセントロメア付近であることを示した。さらに、*S-RNase*を含むゲノムクローン3個を得て、*S-RNase*の周辺約33キロベースの全塩基配列を決定した。これは、これまでに得られている*S-RNase*周辺の塩基配列としては最長のものである。さらに、この領域には、多くの反復配列が存在することを示すとともに、*S-RNase*下流にあって花粉で発現している可能性のある遺伝子GS3を発見して、これが花粉因子の候補となりうることを示した。さらに、GS3の類似配列がゲノム上に非常に多く存在すること、この配列によってFISHを行うと全ての染色体のセントロメアが染色されることを見いだした。これらの結果は、ペチュニアのセントロメアの共通配列をはじめてあきらかにしたことばかりでなく、S遺伝子座がセントロメアのごく近傍にあることもはじめて示した成果でもある。さらに、後者の事実、S遺伝子座内部での組み替えがきわめて起きにくいことの原因の一つであることも説明している。またこの遺伝子周辺の構造がレトロエレメント様の特徴を示しており、いくつかの生物でのセントロメア付近の特徴との類似性から、S遺伝子座の進化について興味深い仮説を提唱した。

以上のように、本論文は、配偶体型自家不和合性の代表例であるペチュニアについて、花粉因子の構造と機能の解明のために多くの新しい知見を示したものであり、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。