アブラナ科植物の雄性側の自家不和合性決定遺伝子の優劣性について

藤本　龍[1*]・川辺隆大[2]・佐々木卓[3]・岡崎桂一[1]

（平成23年７年４日受付）

要　約

アブラナ科植物の自家不和合性は、*S* 複合座に座乗する SRK（*S* receptor kinase）と SP11/SCR（*S* locus protein 11/ *S* locus cysteine rich）の *S* 特異的な相互作用により決定されている。アブラナ科植物の自家不和合性は、胞子体型自家不和合性であることから、花粉の表現型は親の遺伝子型によって決定される。*SP11/SCR* の対立遺伝子間で優劣性が見られる場合、ヘテロ接合体の花粉では、劣性側の *SP11/SCR* の発現が抑制される。この劣性側の *SP11/SCR* の転写抑制は、優性側の *S* 複合座から、劣性側の *SP11/SCR* のプロモーター領域と相同性がある small RNA が発現し、その結果、劣性側の *SP11/SCR* のプロモーター領域に DNA のメチル化が誘導されることで起こる可能性が示唆された。

新大農研報, 64(1):17-26, 2011

キーワード：自家不和合性、アブラナ科、*S* 複合座、一代雑種育種、エピジェネティクス

１．はじめに

植物の中には、自家不和合性という機構を有し、柱頭に受粉した花粉が遺伝的に同一の個体由来か、遺伝的に異なる個体由来かを識別し、遺伝的に同一な個体との受精を回避するものがある。自家不和合性は、生物学的には、近親交配を防ぐことで近交弱勢を回避し、遺伝的な多様性を維持するための機構であると考えられている。自家不和合性は、花粉の表現型が、花粉の遺伝子型（n）そのもので決定される配偶体型自家不和合性と、親である胞子体（2n）によって決定される胞子体型自家不和合性に区別されている（図１）。配偶体型と胞子体型で、自家不和合性の分子機構が異なることから、それぞれの機構は、進化の過程で独立に獲得されたと考えられる（Takayama and Isogai, 2005）。

アブラナ科植物の多くは、胞子体型自家不和合性を有しており、自己花粉が柱頭に受粉しても、花粉の発芽や花粉管の伸長が阻害され、結果として種子が形成されない。アブラナ科植物の自家不和合性は、１つの複合座（*S* 複合座）によって説明され、花粉と雌しべの *S* 対立遺伝子の表現型が一致したときに花粉管伸長が阻害される（図２）（Bateman, 1955）。*S* 複合座には、柱頭側の認識決定遺伝子であるタンパク質キナーゼ活性を持つ膜貫通型の *S* レセプターキナーゼ *SRK*（*S* receptor kinase; Stein *et al.,* 1991, Takasaki *et al.,* 2000）と、花粉側の認識決定遺伝子である *SP11/SCR*（*S* locus protein 11/*S* locus cysteine rich ; Suzuki *et al.,* 1999, Schopfer *et al.,* 1999, Takayama *et al.,* 2000）が座乗している（図 3A）。同じ遺伝子に対して *SP11* と *SCR* という表記が使われるが、ここでは先に公表された Suzuki ら（1999）に従い、*SP11* を用いる。*SRK* と *SP11* の２つの遺伝子は遺伝的に連鎖しており、１つのユニットとして遺伝するため、同様の現象が見られる動物の主要組織適合遺伝子複合体・MHC（major histocompatibility antigen complex）で用いられているハプロタイプという表現を用いて、*S* ハプロタイプと呼ばれるようになった（Nasrallah and Nasrallah, 1993）。

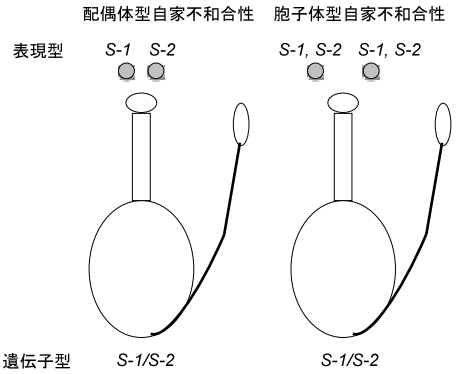


図１　配偶体型自家不和合性と胞子体型自家不和合性の模式図

アブラナ科植物の自家不和合性は、胞子体型自家不和合性であることから、*S* 複合座のヘテロ接合体では、一般的には、花粉側と柱頭側の両方で、それぞれ２つの異なる対立遺伝子の転写・翻訳産物が発現する（共優性）。一方、それぞれ柱頭、花粉では、対立遺伝子間で優劣性が存在し（後述）、最近、花粉側の認識決定遺伝子 *SP11* の対立遺伝子の優劣性がエピジェネティックな制御によって引き起こされることが示された。本総説では、最初にエピジェネティックな転写制御について概説し、アブラナ科植物の自家不和合性と、エピジェネティックな制御による花粉側の自家不和合性決定遺伝子の優劣性について、紹介する。

２．エピジェネティックな遺伝子発現制御

エピジェネティクスは、DNA のメチル化やヒストンの修飾など、DNA 配列の変化を伴わないゲノム制御機構である（藤

[1*]新潟大学大学院自然科学研究科

[2] 株式会社渡辺採種場

[3] Gregor Mendel Institute

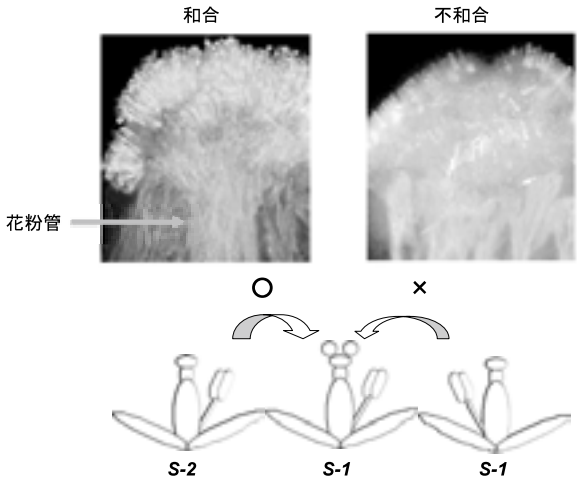


図２　アブラナ科植物の自家不和合性の模式図。花粉と雌しべの *S* ハプロタイプが一致した場合に、花粉の発芽、花粉管の伸長が阻害される（右写真）。異なる *S* ハプロタイプ間での交配では *S-1* ハプロタイプの SRK と *S-2* ハプロタイプの SP11の間で相互作用が起こらず、花粉管が伸長し、受精に至る（左写真）。

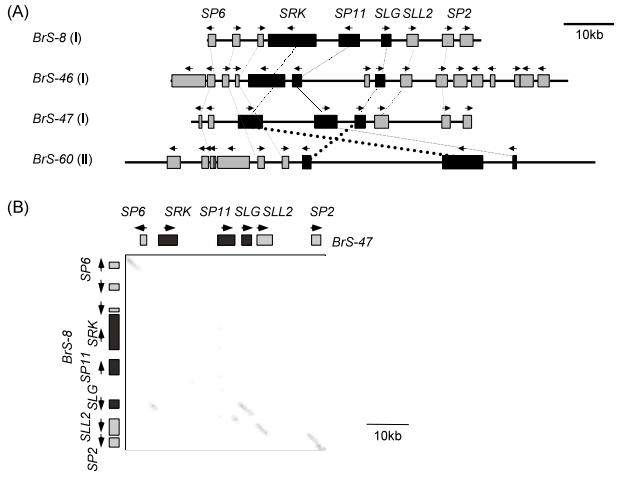


図３　（A）*Brassica rapa* の *S* 複合座の構造の多様性。四角は遺伝子領域を示す。矢印は遺伝子の転写方向を示す。I; class I の *S* ハプロタイプ、II; class II の *S* ハプロタイプ。点線（太字）は、class I と class II の *SRK* と *SLG* の位置関係が反転していることを示す（Fukai *et al.,* 2003）。（B）Harr plot 分析を用いた *S* 複合座の比較。*SRK* と *SP11* が存在する *SP6* から *SLL2* の間の領域は非常に多様性に富むことが分かる。Harr plot 分析は、1 ユニット20bp で比較し、19bp の相同性が見られた場所にプロットするように設定した。

本と石川 , 2010）。本節では特に、後述する自家不和合性の優劣性に関わることが明らかとなった、small RNA と DNA のメチル化について紹介する。

DNA のメチル化はシトシン残基に見られる修飾で、糸状菌やマウス、植物など、広い生物種で保存されている。DNA メチル化はトランスポゾンや反復配列など、ヘテロクロマチン領域に多く見られ、一般的に転写抑制に働いていると考えられている。特に、プロモーター領域に見られる DNA のメチル化は、遺伝子の転写と負の相関関係があることが示されている（Chan *et al.,* 2005）。

シロイヌナズナでは、DNA メチル化酵素として３つの遺伝子が同定されており、それらは機能的に「維持型 DNA メチル化酵素」と「*de novo* DNA メチル化酵素」の２つに分類される。維持型 DNA メチル化酵素としては、*MET1*（methyltransferase 1）と植物に特異的な *CMT3*（chromomethylase 3）があり、それぞれ CG サイト、CNG サイト（N は、A、T、C、G のいずれか）のメチル化維持に関わっている（Chan *et al.,* 2005）。これらの遺伝子は、同じアブラナ科植物の *Brassica rapa* でもオーソログが同定されている（Fujimoto *et al.,* 2006a）。

de novo DNA メチル化は *DRM2*（domains rearranged methylase 2）により誘導され、CHH サイト（H は A、T、C のいずれか）のメチル化は *DRM2* による *de novo* DNA メチル化を受けることで維持されていると考えられている。植物では、この *de novo* DNA メチル化機構に small RNA が関わっていることが示されている。この機構は RNA 依存的 DNA のメチル化「RdDM（RNA-directed DNA methylation）」とよばれ、関連因子がこれまでに数多く同定されている（Matzke *et al.,* 2009）。small RNA の生成と標的領域への誘導には、ともに植物に特異的な RNA ポリメラーゼ、Pol IV、Pol V が関与している（Onodera *et al.,* 2005, Herr *et al.,* 2005, Kanno *et al.,* 2005）。 Pol IV の転写産物は、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ、Dicer タンパク質 など、真核生物で広く保存された RNAi 因子によるプロセシングを経て、24 ヌクレオチドの small RNA となり、Argonaute タンパク質に取り込まれたあと、ゲノム領域との相同性により標的領域に誘導される。最終的に DRM2 が標的領域に誘導され、DNA のメチル化反応が起こる（図４）（Cao and Jacobsen, 2002, Zilberman *et al.,* 2003, Xie *et al.,* 2004）。

３．アブラナ科植物の自家不和合性の一代雑種品種への利用

動物、植物では、同一種内のある組合せの両親間の交雑により得られた F_1 雑種個体が、両親の特性よりも優れた形質を示すヘテローシス（雑種強勢）という現象が知られている。この現象は、動植物の育種改良において、重要な遺伝現象である。強いヘテローシスを示す F_1 の集団を生む交配組合せを選定し、その F_1 種子の採種を行う手法が一代雑種育種である（図５）。固定品種と比べた場合、一代雑種品種の長所は、生産性の向上と、生産物の均一性などである。一代雑種品種が普及するためには、F_1 品種そのものの性能の高さとともに、採種コストも重要であり、両者の兼ね合いによって決まる。同じ種の他の集団からの花粉混入を防ぐ方法としては、地理的隔離があげられる。次に種子親の集団内の個体間の交雑を防ぐ方法としては、自家不和合性や雄性不稔性などの遺伝的制御が実用化されている。

アブラナ科植物には、主要なアブラナ科野菜である *Brassica oleracea* のキャベツ、ブロッコリー、カリフラワーや *B. rapa* のカブ、ハクサイ、ツケナ類、チンゲンサイ及び、*Raphanus sativus* のダイコンが含まれ、自家不和合性を利用した一代雑種品種の採種が商業的に行われている。前述のとおり、自家不和合性は自家受精を抑制する機構であり、これは、別個体であっても同一 *S* ハプロタイプ間では受精が起こらない。そこで異

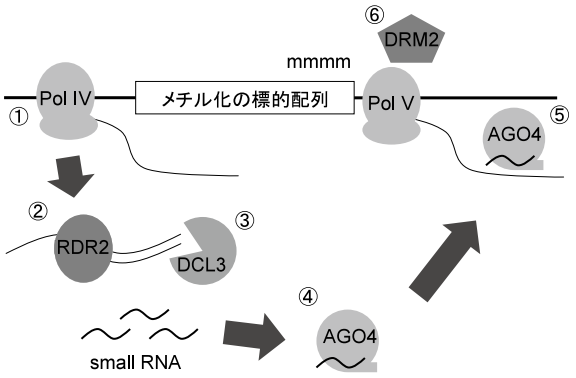


図４　RNA 依存的 DNA メチル化（RdDM）機構の概略を示す。① DNA メチル化の標的部位から、Pol IV による転写が起こる。② Pol IV の転写産物は、RNA 依存 RNA ポリメラーゼの RDR2により二本鎖 RNA となる。③ DCL3 により、24塩基の small RNA に切断される。④ small RNA が AGO4に取り込まれる。⑤ Pol V の転写により、AGO4が標的部位に誘導される。⑥ *de novo* メチル化酵素の DRM2によりメチル基が付加される。

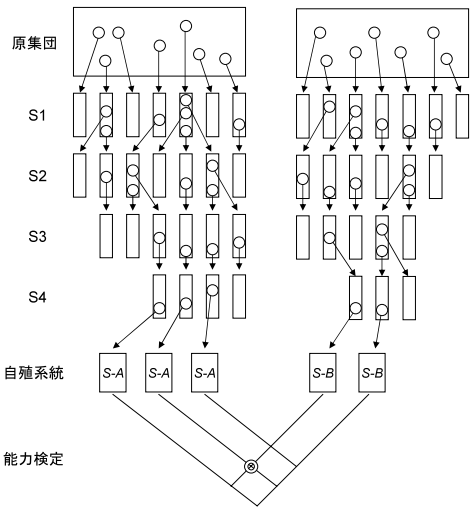


図５　自殖系統の作出と単交雑による一代雑種育種の模式図。○は選抜した優良個体を示し、◎は F_1における能力検定で優良な組合せを示す。*S-A*、*S-B* は *S* ハプロタイプを示す。

なる *S* ハプロタイプの自殖系統集団を用い、同一 *S* ハプロタイプの個体間では受精がおこらないようにし、異なる *S* ハプロタイプの集団間でのみ受精がおこり、F_1種子が形成されるようにしたのが、一代雑種品種の採種における自家不和合性の利用である（図６）。このようにアブラナ科野菜では、同一 *S* ハプロタイプで集団内をそろえる必要があるため、自殖系統間交配による一代雑種品種が大部分を占めており、十分に F_1種子が得られる場合には、自家不和合性遺伝子についての単交雑が用いられている（図６）。

自家不和合性は、高温等の環境要因により不安定になることがあり、その際は自殖種子の混入が起こり、種子生産において非常に大きな問題となる。一代雑種育種においては、自家不和合性が強く、安定したものが望まれる。自家不和合性の強さに関わる要因について、分子生物学的な解析はあまり進んでいないが、最近 QTL 解析を用いて、自家不和合性の強さに関わる領域が同定された（Hatakeyama *et al.,* 2010）。強い自家不和合性が望まれる一方で、F_1種子の生産では親系統の自殖により種子増殖を行う必要があり、この際は自家不和合性を打破することが必要である。自殖は蕾受粉によって可能となるが、これは多大な労力を要する。そこで、自家不和合性を打ち消す様々な方法が行われており、中でも高濃度炭酸ガス処理は効果的であることが明らかにされ、広く利用されている（Nakanishi and Hinata, 1973）。

一代雑種育種では、両親間で異なる *S* ハプロタイプを用いる必要があることから、育種系統の *S* ハプロタイプの判定が必要である。交配試験による *S* ハプロタイプの判定は、多大な時間と労力を要するので、簡便な *S* ハプロタイプ判定法が必要となる。*SRK*、*SP11*、*SLG* 遺伝子の塩基配列の多型を利用した DNA レベルでの *S* ハプロタイプ同定法が考案されている。一つは、*SLG* や *SRK* を用いた PCR-RFLP 法による *S* ハプロタイプの判定法である（Brace *et al.,* 1993, Nishio *et al.,* 1994, Nishio *et al.,* 1997）。これは、交配検定に比べ、非常に簡便であり、最も普及している方法である。もう一つの方法は、*S* ハプロタイプ間で塩基配列の多様性が大きい *SP11* をプローブに用いた dot-blot 分析による *S* ハプロタイプ判定法である（Fujimoto and Nishio, 2003, Oikawa *et al.,* 2010）。この方法は、電気泳動を行わずに多検体の解析を行うことができ、植物の育種に適した方法である。しかし、全ての *S* ハプロタイプの *SP11* の配列決定が必要であり、現時点では *SP11* の塩基配列が決定されていない *S* ハプロタイプが存在するため、その解析が待たれる。このような多くの *S* 遺伝子の塩基配列を決定

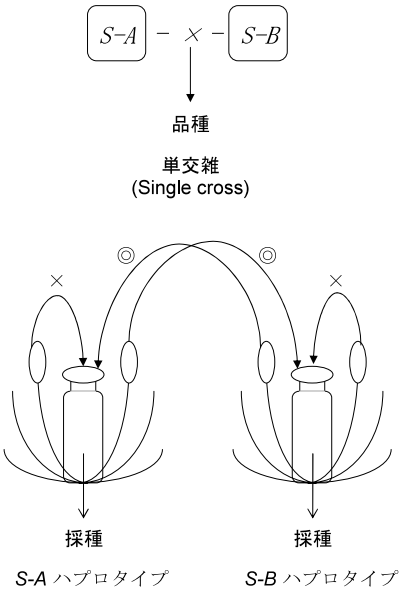


図６　不和合性を利用した自殖系統間交雑。◎は和合性、× は不和合性を示す。*S-B* ハプロタイプの自家不和合性が不完全である場合には、*S-B* 株からできた種子には自殖種子が混入する恐れがあるため採種を行わない場合がある。

するため、遺伝資源として*S*ハプロタイプを収集し、多数の*S*ホモ系統を*S*テスターラインとして整備することは、一代雑種育種において重要である。

4．アブラナ科植物の自家不和合性の分子生物学的な研究

アブラナ科植物の自家不和合性では、分子生物学的な研究によって、花粉と雌しべの自家不和合性の認識決定遺伝子*SP11*と*SRK*が同定された。これらの遺伝子の*S*ハプロタイプ間の多様性や、それらの遺伝子が座乗する*S*複合座のゲノム構造も明らかとなり、また、*SP11*の優劣性がエピジェネティックな制御によって起こることが明らかとなった。ここでは、それらの研究成果について述べる。

4-1. *S*特異的な相互作用による自家不和合性反応の誘導

アブラナ科植物の*S*ハプロタイプの数は*B. oleracea*で50、*B. rapa*で約30同定されている（Nou *et al.,* 1993, Ockendon, 2000）。*B. rapa*、*B. oleracea*、*R. sativus*で数多くの*S*ハプロタイプの*SRK*、*SP11*のcDNAの塩基配列が決定された（Watanabe *et al.,* 2000, Sato *et al.,* 2002, Okamoto *et al.,* 2004, Takuno *et al.,* 2007）。*S*ハプロタイプは、*SRK*と*SP11*の相同性に基づいて2つのグループ（class I、class II）に分類されている。*S*ハプロタイプは、*S-1*、*S-2*とし、それぞれの*SRK*、*SP11*対立遺伝子は*SRK-1*、*SP11-1*と表記した。

SRKとSP11のアミノ酸配列は、*S*ハプロタイプ間で多様性が見られ、この多様性が同一*S*ハプロタイプ由来の花粉と、異なる*S*ハプロタイプ由来の花粉の識別に重要であると考えられている。SRKでは3つの変異に富んだ領域であるHVR（hypervariable region）の存在が明らかとなり、この領域がSRKの認識特異性に関与する可能性が示唆された（Kusaba and Nishio, 1999）。SP11は非常に変異に富んでいるが、8つのシステイン残基が保存されていることが示された（Takayama *et al.,* 2000, Watanabe *et al.,* 2000, Sato *et al.,* 2002, Okamoto *et al.,* 2004）。

自家不和合性の反応は、SRKとSP11の*S*ハプロタイプ特異的なタンパク質間相互作用によって起こることが示されている（Takayama *et al.,* 2001, Kachroo *et al.,* 2001）。この*S*特異的なタンパク質間の相互作用の後、あるシグナルが柱頭の乳頭細胞に伝達され、最終的に花粉管伸長が阻害されると考えられている。幾つかの遺伝子については自己認識分子の花粉リガンドと柱頭レセプターの相互作用以降の反応に関与することが示されているが、*S*特異的な相互作用から花粉管の侵入阻害に至る過程の全容は未だ明らかとなっていない（Fujimoto and Nishio, 2007）。

4-2. 種間ペア

B. rapa、*B. oleracea*、*R. sativus*の*SRK*の*S*ドメインと*SP11*の塩基配列で系統樹を作成した結果、種特異的なクラスター形成が見られなかった（Sato *et al.,* 2002, Okamoto *et al.,* 2004）。*SRK*の塩基配列を*S*ハプロタイプ間で比較した際に、*B. oleracea*の*S-7*（*BoS-7*）と*B. rapa*の*S-46*（*BrS-46*）の間でHVRにおけるアミノ酸変異が2つしかないことが報告され（Kusaba and Nishio, 1999）、*SP11*においても、アミノ酸変異が3つと相同性が高いことが示された（Kimura *et al.,* 2002）。*B. rapa*と*B. oleracea*の間で*SRK*と*SP11*の相同性が高い組合せ（種間ペア）が複数見つかり（Sato *et al.,* 2002）、*B. rapa*と*R. sativus*の間でも*SRK*と*SP11*の相同性が高い組合せが存在した（Okamoto *et al.,* 2004）。

種間ペアの1組（*BoS-7*と*BrS-46*）が同じ認識特異性を有することが、*B. oleracea*と*B. rapa*の種間雑種を用いた実験により明らかにされた（Kimura *et al.,* 2002）。この組合せに加えclass Iの4つの種間ペアの組合せについても、種間雑種や形質転換体及び、組換えSP11タンパク質を用いたBioassayを用いて、同じ認識特異性を有することが示された（Sato *et al.,* 2003）。また、*B. rapa*と*R. sativus*の組合せにおいても、形質転換実験から同じ認識特異性を有することが示された（Sato *et al.,* 2004）。class IIの*S*ハプロタイプ内でも*B. rapa*と*B. oleracea*の間で3つの種間ペアが見いだされた。3つの組合せのうち、認識特異性は、1組は少し異なり、1組は完全に異なり、もう1組は同じであった（Sato *et al.,* 2006）。以上の結果から、このような組合せは、種・属分化前は同一の*S*ハプロタイプであり、class Iでは同じ自己認識特異性を種分化後も維持してきたと考えられ、class IIの種間ペアは同じ認識特異性を失う傾向にあるようである。

4-3. *S*複合座のゲノム構造

複数の*S*ハプロタイプにおいて、*SRK*、*SP11*が座乗する広範囲な*S*複合座のゲノム構造が明らかになっており（Suzuki *et al.,* 1999, Fukai *et al.,* 2003, Fujimoto *et al.,* 2006b, Takuno *et al.,* 2007）、*S*複合座の塩基配列分析から、*S*ハプロタイプ間で*SRK*と*SP11*遺伝子の配置や遺伝子間距離及び転写方向が異なることが明らかになっている（図3A）。さらに、*S*複合座には*SRK*と*SP11*の他にも複数の遺伝子が座乗していることが知られている（図3A）（Nasrallah, 2000）。*S*複合座のゲノム構造の比較解析が行われ、*SP6*より外側と*SLL2*より外側では*S*ハプロタイプ間で相同性が高いのに対して、*SRK*と*SP11*が存在する*SP6*から*SLL2*の間の領域は非常に多様性に富むことが示された（Cui *et al.,* 1999, Shiba *et al.,* 2003）（図3B）。class IIの*S*ハプロタイプの*S*複合座のゲノム構造は、class Iの*S*複合座のゲノム構造と大きく異なるものではないが、*SRK*と*SLG*の位置関係がclass Iのそれと反転していることが明ら

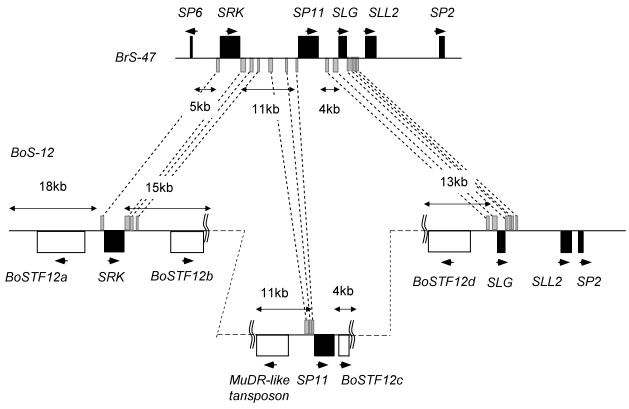


図7　*B. rapa*と*B. oleracea*の種間ペアでの*S*複合座の比較。*BrS-47*と*BoS-12*は同じ認識特異性を持つ種間ペア。四角（黒）は遺伝子領域、四角（白）はトランスポゾン、四角（灰色）は種間ペアでの相同領域を示す。Fujimoto *et al.,* 2006bより図を引用（一部改編）。

かとなった（図3A）（Fukai *et al.,* 2003）。class IIの4つの*S*ハプロタイプにおいて、*SRK*と*SP11*の間の領域は多様性に富んでいるが、*SRK*と*SP11*の配置が保存されていることが示された（Kakizaki *et al.,* 2006）。このような*S*ハプロタイプ間の*S*複合座の構造の多様性が*S*複合座内での組換え抑制に関わっていると考えられている。

種分化前は同一の*S*ハプロタイプであったと推定される種間ペア3組を用いて*S*複合座のゲノム構造を比較した結果、認識分子である*SRK*と*SP11*の遺伝子構造は比較的保存されているが、それらの遺伝子が座乗する*S*複合座のゲノム構造は大きく異なることが示され、*B. oleracea*の*S*複合座の方が*B. rapa*の*S*複合座よりも広範囲に及んでいることが明らかになった。このような*S*複合座の大きさの違いは、種分化以降にトランスポゾンが*B. oleracea*の*S*複合座に挿入された結果であることが示唆された（図7）（Fujimoto *et al.,* 2006b）。

4-4. *S*ハプロタイプ間の優劣性

アブラナ科植物の自家不和合性は胞子体型であることから、*S*ハプロタイプ間には、花粉、柱頭の両者において優劣性が存在する（Thompson and Taylor, 1966）。*S-1*と*S-2*のヘテロ接合体で、*S-1*が*S-2*に対して優性であった場合（*S-1>S-2*）、ヘテロ接合体（*S-1/S-2*）の表現型は*S-1*となる（図8）。*S*ハプロタイプ間の優劣関係は、柱頭側と花粉側で独立であり、優劣性の機構も両者で異なる。柱頭における優劣性については形質転換体を用いて解析されており、柱頭の優劣性はSRKのコード領域の塩基配列そのものが決定し、転写制御によらないことが示されているが、その機構は未だ明らかになっていない（Hatakeyama *et al.,* 2001）。花粉側の優劣性については、交配実験や転写解析から以下の4つの知見が得られている。

⑴ class IIはclass Iに対して劣性を示す（Nasrallah and Nasrallah, 1993）。優劣性のある*S*ハプロタイプのヘテロ個体では、劣性の*SP11*の発現が抑制されていることが示された（Kusaba *et al.,* 2002, Shiba *et al.,* 2002）（図9）。

⑵ *B. rapa*のclass IIの4ハプロタイプ間で花粉の優劣性について調べると、4ハプロタイプの優劣関係が直線的になること（*BrS-44>BrS-60>BrS-40>BrS-29*）が示された。*BrS-44*と*BrS-60*のヘテロ接合体（*BrS-44/BrS-60*）では、*BrSP11-60*の発現は抑制されるが、*BrS-40*と*BrS-60*のヘテロ接合体（*BrS-40/BrS-60*）では、*BrSP11-60*の発現は抑制されず、*BrSP11-40*の発現が抑制される（図10）。このように、*S*ハプロタイプの組合せによって優劣性が変わることが示されている（Kakizaki *et al.,* 2003）。

⑶花粉側の優劣性は、異なる染色体間で起こることが示されている。*Brassica napus*（AACC, 2n=38）は、2種類のゲノムを有する異質倍数体で、その構成ゲノム種は、*B. rapa*（AA, 2n=20）と*B. oleracea*（CC, 2n=18）であることが知られている。人工的に作成した合成*B. napus*や自然界にある*B. napus*において、*B. rapa*のclass Iの*S*ハプロタイプが、*B. oleracea*のclass IIの*S*パプロタイプに対して、優性であることが示されている（Kimura *et al.,* 2002, Okamoto *et al.,* 2007）（図11）。

⑷自家和合性品種Yellow Sarson（*S-f2,* class Iの*S*ハプロタイプ）は、*SP11*のプロモーター領域に欠失が見られ、*SP11*の発現が見られない。しかし、*S-f2*とclass IIの*S*ハプロタイプとのヘテロ個体では、class IIの*SP11*の発現抑制がみられることから（図9）、class IIの*SP11*の発現抑制に、class Iの*SP11*の発現が必ずしも必要ないことが示された（Fujimoto *et al.,* 2006c）。この現象は、*B. napus*でも見られている。*B. rapa*ゲノム由来の優性の*S*ハプロタイプは*SP11*に突然変異があり機能を失っており、*B. oleracea*ゲノム由来の劣性の*S*ハプロタイプは、優劣性により、*SP11*の転写が抑制されることで機能していない。その結果、*B. napus*は、両ハプロタイプの*S*遺伝子が機能を失い、自家和合性を示すことが明らかとなった（図11）（Okamoto *et al.,* 2007）。*B. napus*は2種類の*S*複合座を有しており、自家和合性になるには、2つの*S*ハプロタイプが突然変異で機能を欠損する必要があり、自家和合性になる確率は低くなる。しかし、優劣性がある*S*ハプロタイプの組合せでは、1つの*S*ハプロタイプの突然変異で自家和合性になることができるため、自家和合性を獲得しやすくなると考えられ、自家和合性種*B. napus*の成立には、*S*ハプロタイプの優劣性が重要であると結論づけている（Okamoto *et al.,* 2007）。

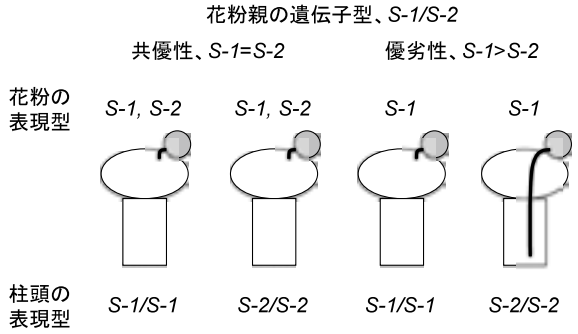


図8　アブラナ科植物の花粉側の優劣性の模式図



図9　花粉側の優劣性。*BrSP11-60*をプローブに用いたノーザンブロット分析。優劣性のあるヘテロ個体では、劣性側（class II）の*SP11*の発現が抑制される。

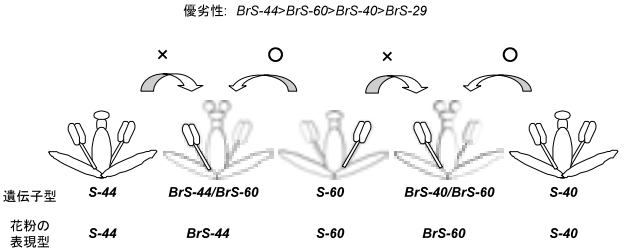


図10　Class IIの花粉側の優劣関係の模式図。

4-5.　花粉側の優劣性とエピジェネティックな制御

*SP11*の優劣性はエピジェネティックな制御を受けている可能性が示唆されていたが、その関与は示されていなかった。し

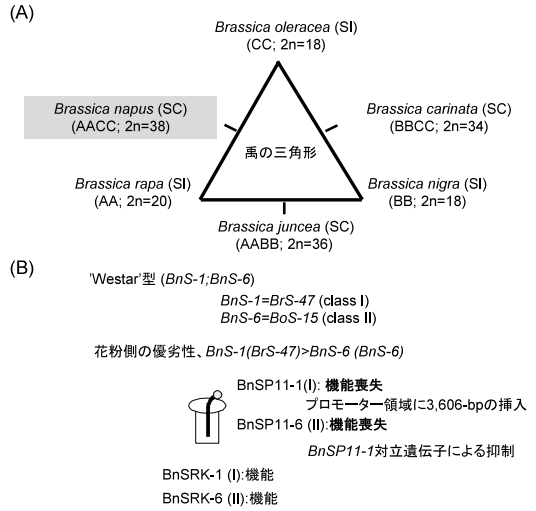


図11.（A）禹の三角形。SC、自家和合性。SI、自家不和合性。（B）*B. napus* の自家和合性の原因の模式図。*BnS-1*、*BnS-6*はそれぞれ *BrS-47*（class I）、*BoS-15*（class II）由来であることが示されている（Okamoto *et al.,* 2007）。*BnS-1*の *SP11*は突然変異により機能を喪失し、*BnS-6*の *SP11*は異なる染色体間の優劣性 、*BnS-1*（*BrS-47*, class I）>*BnS-6*（*BoS-15*, class II）により転写が抑制され、機能しない。

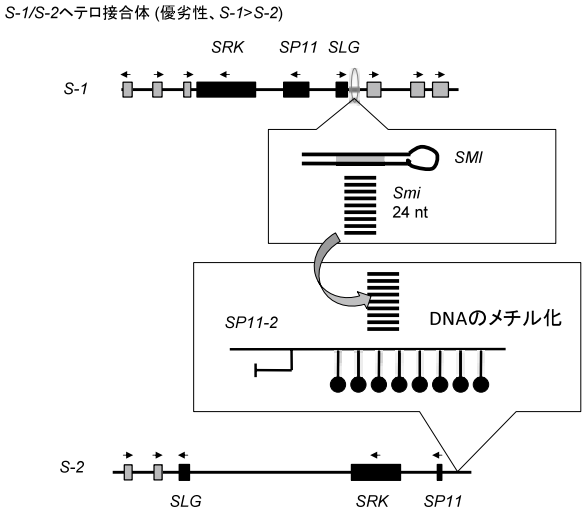


図12　Class I の *S* 複合座由来の small RNA が Class II の *SP11*のプロモーター領域に DNA のメチル化を誘導する。Class I の *S* ハプロタイプ（*S-1*）の *SLG* の下流領域から、非コード RNA、*SMI* が転写される。*SMI* は class II の *S* ハプロタイプ（*S-2*）の *SP11*のプロモーター領域と相同性が見られる。*SMI* は不完全なヘアピン構造を形成し、24ヌクレオチドの small RNA、*Smi* が生成される。*Smi* により、class II の *S* ハプロタイプ（*S-2*）の *SP11*のプロモーター領域の DNA のメチル化が誘導され、その結果、class II の *S* ハプロタイプ（*S-2*）の *SP11*のみ発現が抑制される。

かし、Shiba ら（2006）は、タペート細胞のみの DNA を抽出し、優劣のあるヘテロ個体を用いて、両ハプロタイプの *SP11* の DNA のメチル化を Bisulfite 法により調べた結果、劣性 *SP11* のプロモーター領域にのみ DNA のメチル化が見られることを示した。この *de novo* の DNA のメチル化は *SP11* が発現する前のステージで起こることが示された。さらに、この *de novo* の DNA メチル化は、葉、柱頭、花粉では見られなかった。このことから、劣性 *SP11* の発現抑制は時期・組織特異的な *de novo* の DNA のメチル化によって制御されている可能性が示された（Shiba *et al.,* 2006）。

Tarutani ら（2010）は、この時期、組織特異的な *de novo* の DNA のメチル化が、non-CG（CNG または CHH）サイトに起こっていたことから、small RNA を介した、RNA 依存的 DNA メチル化によって引き起こされている可能性を考えた。そこで、class I と class II のヘテロ接合体では、class I の *S* 複合座から、class II のプロモーター領域の DNA のメチル化を誘導する small RNA 発現していると仮定し、class I の *S* 複合座から、class II のプロモーター領域と相同性がある領域を探した。その結果、class I の *S* 複合座の *SLG* の下流 3kb の領域に class II の *SP11* のプロモーター領域と相同性のある配列（18/19 ヌクレオチドが一致）を含む領域を見出し、*SMI*（*SP11-Methylation Inducing region*）と名付けた（図 12）。この領域からは、非コード RNA の転写産物が確認され、タペート組織で特異的に発現していた。さらに、この転写産物は、不完全なヘアピン構造を形成することから、この領域から、small RNA が発現している可能性が推測された。Small RNA のライブラリーから、*SMI* と相同性がある small RNA をスクリーニングし、24 ヌクレオチドの small RNA（*Smi*）を見出した。さらに、*SMI* 領域を、class II の *S* ハプロタイプのホモ接合体に導入した結果、*SP11* のプロモーター領域に DNA のメチル化が誘導され、転写が抑制された。以上の結果から、class I の *S* ハプロタイプの *SMI* 領域から生じた small RNA、*Smi* によって、class II の *S* ハプロタイプの *SP11* のプロモーター領域に DNA のメチル化が起こり、class II の *SP11* の発現が抑制され、優劣性が生じる可能性が示された（図 12）（Tarutani *et al.,* 2010）。

5. おわりに

Tarutani ら（2010）のモデルは、上記の（4-4）項目の（1）、（3）、（4）においても説明がつく。しかし一方で、（4-4）項目の（2）で示したように、花粉側の優劣性は class II 内の *S* ハプロタイプ間でも見られる。Class II の *S* ハプロタイプ間の優劣性においても、Class I と II の優劣性と同様に時期・組織特異的な DNA のメチル化が劣性 *S* ハプロタイプのプロモーター領域に確認されている（Shiba *et al.,* 2006）。しかし、Class II の *S* ハプロタイプ間では、プロモーター領域に高い相同性が見られることから、優性 *S* ハプロタイプから生じる small RNA が劣性 *S* ハプロタイプの *SP11* のプロモーター領域にのみ *de novo* の DNA のメチル化を誘導するといった Tarutani ら（2010）のモデルでは説明が難しい。また、花粉側の優劣性は Class I 同士でも見られることから、これらの優劣性は、他の分子機構によって、制御されている可能性が示唆され、更なる研究の進展が期待される。

（4-3）項目で示したように、*S* 複合座は *S* ハプロタイプ間で非常に多様性に富んでおり、特に *B. oleracea* ではトランスポ

ゾンの挿入により *S* 複合座の領域が広がり、*S* ハプロタイプ間の *S* 複合座の多様性はさらに大きくなっていると推測される。花粉側の優劣性は、一般的に class I は class II に対して優性を示すことから、*SMI* 領域が、Class I の *S* ハプロタイプで保存されている可能性が示唆され、class I の *S* ハプロタイプ、特に *B. oleracea* において、*SMI* 領域が保存されているかは興味深い。

class II の *SP11* のプロモーター領域と相同性のある small RNA は、*Smi* のみで、これは、プロモーター領域の 18bp に対応した場所にしか見られない。しかし、DNA のメチル化は、およそ 300bp に渡ってみられる。DNA のメチル化が広がるという報告はなされているが、その分子機構は未だ明らかとなっていない部分が多い。class II の *SP11* のプロモーター領域の DNA のメチル化が、どのような分子機構で広がるかは興味深い。

SMI 領域を Class II の *S* ハプロタイプに導入した際に、*SP11* のプロモーター領域に DNA のメチル化が見られ、*SP11* の転写が抑制されることから、*SMI* が DNA のメチル化を誘導し、その結果 *SP11* の転写が抑制されると考えられた（Tarutani *et al.,* 2010）。一般的にプロモーター領域の DNA のメチル化は転写の抑制に働くと考えられているが、一方で、DNA のメチル化がプロモーター領域に見られても、転写が必ず抑制される訳ではない。DNA のメチル化と *SP11* の転写抑制の関連性については、未だ、状況証拠にすぎず、実際に、今回見られた DNA のメチル化が *SP11* の発現を抑制しているかは明らかとなっていない。シロイヌナズナでは *de novo* の DNA のメチル化に関わる遺伝子が特定されており、また、small RNA の生成に関わる遺伝子も明らかとなっている。これらの遺伝子の変異体は、この時期・組織特異的な DNA のメチル化と *SP11* の転写抑制の関わりを調べるのに有効となるだろう。

引用文献

Bateman, A. J. 1955. Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity,* **9**: 52-68.

Brace, J., D. J. Ockendon, G. J. King. 1993. Development of a method for the identification of *S* alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex Plant Reprod.*, **6**: 133-138.

Cao, X., S. E. Jacobsen. 2002. Role of the Arabidopsis *DRM* methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.,* **12**: 1138-1144.

Chan, S. W., I. R. Henderson, S. E. Jacobsen. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.,* **6**: 351-360.

Cui, Y., N. Brugiere, L. Jackman, Y. M. Bi, S. J. Rothstein. 1999. Structural and transcriptional comparative analysis of the *S* locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell,* **11**: 2217-2231.

Fujimoto, R., T. Nishio. 2003. Identification of *S* haplotypes in *Brassica* by dot blot analysis of *SP11* alleles. *Theor. Appl. Genet.,* **106**:1433-1437.

Fujimoto, R., T. Sasaki and Nishio T. 2006a. Characterization of DNA methyltransferase genes in *Brassica rapa*. *Genes Genet. Syst.,* **81**:235-242.

Fujimoto, R., K. Okazaki, E. Fukai, M. Kusaba, T. Nishio. 2006b. Comparison of the genome structure of the self-incompatibility (*S*) locus in interspecific pairs of *S* haplotypes. *Genetics,* **173**: 1157-1167.

Fujimoto, R., T. Sugimura, E. Fukai, T. Nishio. 2006c. Suppression of gene expression of a recessive *SP11/SCR* allele by an untranscribed *SP11/SCR* allele in Brassica self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.,* **61**:577-587.

Fujimoto, R., T. Nishio. 2007. Self-incompatibility. *Adv. Bot. Res.,* **45**: 139-154.

藤本龍・石川亮 . 2010. エピジェネティクスが制御する植物の形質. *育種学研究* , **12**: 123-131.

Fukai, E., R. Fujimoto, T. Nishio. 2003. Genomic organization of the *S* core region and the *S* flanking regions of a class-II S haplotype in *Brassica rapa*. *Mol. Gen. Genomics,* **269**: 361-369.

Hatakeyama, K., T. Takasaki, G. Suzuki, T. Nishio, M. Watanabe, A. Isogai, K. Hinata. 2001. The *S* receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in *Brassica*. *Plant J.,* **26**: 69-76.

Hatakeyama, K., A. Horisaki, S. Niikura, Y. Narusaka, H. Abe, H. Yohiaki, M. Ishida, H. Fukuoka, S. Matsumoto. 2010. Mapping of quantitative trait loci for high level of self-incompatibility in *Brassica rapa* L. *Genome,* **53**: 257-265.

Herr, A. J., M. B. Jensen, T. Dalmay, D. C. Baulcombe. 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science,* **308**: 118-120.

Kachroo, A., C. R. Schopfer, M. E. Nasrallah, J. B. Nasrallah. 2001. Allele-specific receptor-ligand interaction in *Brassica* self-incompatibility. *Science,* **293**: 1824-1826.

Kakizaki, T., Y. Takada, A. Ito, G. Suzuki, H. Shiba, S. Takayama, A. Isogai, M. Watanabe. 2003. Linear dominance relationship among four class-II *S* haplotypes in pollen is determined by the expression of *SP11* in Brassica self-incompatibility. *Plant Cell Physiol.,* **44**: 70-75.

Kakizaki, T., Y. Takada, T. Fujioka, G. Suzuki, Y. Satta, H. Shiba, A. Isogai, S. Takayama, M. Watanabe. 2006. Comparative analysis of the *S*-intergenic region in class-II *S* haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Genes Genet. Syst.*, **81**: 63-67.

Kanno, T., B. Huettel, M. F. Mette, W. Aufsatz, E. Jaligot, L. Daxinger, D. P. Kreil, M. Matzke, A. J. Matzke. 2005. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.,* **37**: 761-765.

Kimura, R., K. Sato, R. Fujimoto, T. Nishio. 2002. Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant J.,* **29**: 215-223.

Kusaba, M., T. Nishio. 1999. Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar *SLG* alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant J.,* **17**: 83-91.

Kusaba, M., C. W. Tung, M. E. Nasrallah, J. B. Nasrallah. 2002. Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible *Arabidopsis lylata*. *Plant Physiol.,* **128**: 17-20.

Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel, A. J. Matzke.

2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.,* **21**: 367-376.

Nakanishi, T., K. Hinata. 1973. An effective time for CO2 gas treatment in overcoming self-incompatibility in Brassica. *Plant Cell Physiol.,* **14**: 873-879.

Nasrallah, J.B., M. E. Nasrallah. 1993. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell,* **5**: 1325-1335.

Nasrallah, J. B. 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Curr. Opin. Plant Biol.,* **3**: 368-373.

Nishio, T., K. Sakamoto, J. Yamaguchi. 1994. PCR-RFLP of the *S*-locus for the identification of breeding lines in cruciferous vegetables. *Plant Cell Rep.,* **13**: 546-550.

Nishio, T., M. Kusaba, K. Sakamoto, D. J. Ockendon. 1997. Polymorphism of the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.,* **95**: 335-342.

Nou, I. S., M. Watanabe, A. Isogai, K. Hinata. 1993. Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex Plant Reprod.,* **6**: 79-86.

Ockendon, D. J. 2000. The *S*-allele collection of *Brassica oleracea. Acta Hortic.,* **539**: 25-30.

Oikawa, E., S. Takuno, A. Izumita, K. Sakamoto, H. Hanzawa, H. Kitashiba, T. Nishio. 2010. Simple and efficient methods for S genotyping and *S* screening in genus Brassica by dot-blot analysis. *Mol. Breed.*, in press.

Okamoto, S., Y. Sato, K. Sakamoto, T. Nishio. 2004. Distribution of similar self-incompatibility (*S*) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex Plant Reprod.,* **17**: 33-39.

Okamoto, S., M. Odashima, R. Fujimoto, Y. Sato, H. Kitashiba, T. Nishio. 2007. Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in *S*-locus genes. *Plant J.,* **50**: 391-400.

Onodera, Y., J. R. Haag, T. Ream, P. C. Nunes, O. Pontes, C. S. Pikaard. 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell,* **11**: 613-622.

Sato, K., T. Nishio, R. Kimura, M. Kusaba, T. Suzuki, K. Hatakeyama, D. J. Ockendon, Y. Satta. 2002. Co-evolution of the *S*-locus genes, *SRK, SLG* and *SP11/SCR*, in *Brassica oleracea and B. rapa. Genetics,* **162**: 931-940.

Sato, Y., R. Fujimoto, K. Toriyama, T. Nishio. 2003. Commonality of self-recognition specificity of *S* haplotypes between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Mol. Biol.,* **52**: 617-626.

Sato Y, S. Okamoto, T. Nishio. 2004. Diversification and alteration of recognition specificity of the pollen ligand SP11/SCR in self-incompatibility of Brassica and Raphanus. *Plant Cell,* **16**: 3230-3241.

Sato, Y., K. Sato, T. Nishio. 2006. Interspecific pairs of class II *S* haplotypes having different recognition specificities between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. P*lant Cell Physiol.,* **47**: 340-345.

Schopfer, C. R., M. E. Nasrallah, J. B. Nasrallah. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica. Science,* **286**: 1697-1700.

Shiba, H., M. Iwano, T. Entani, K. Ishimoto, H. Shimosato, F. S. Che, Y. Satta, A. Ito, Y. Takada, M. Watanabe, A. Isogai, S. Takayama. 2002. The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell,* **14**: 491-504.

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

Shiba, H., T. Kakizaki, M. Iwano, Y. Tarutani, M. Watanabe, A. Isogai, S. Takayama. 2006. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nat. Genet.,* **38**: 297-299.

Stein, J. C., B. Howlett, D. C. Boyes, M. E. Nasrallah, J. B. Nasrallah. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88**: 8816-8820.

Suzuki, G., N. Kai, T. Hirose, K. Fukui, T. Nishio, S. Takayama, A. Isogai, M. Watanabe, K. Hinata. 1999. Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of S^9 haplotype of *Brassica campestris (*syn. *rapa). Genetics,* **153**: 391-400.

Takasaki, T., K. Hatakeyama, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai, K. Hinata. 2000. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature,* **403**: 913-916.

Takayama, S., H. Shiba, M. Iwano, H. Shimosato, F. S. Che, N. Kai, M. Watanabe, G. Suzuki, K. Hinata, A. Isogai. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **97**: 1920-1925.

Takayama, S., H. Shimosato, H. Shiba, M. Funato, F. S. Che, M. Watanabe, M. Iwano, A. Isogai. 2001. Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature,* **413**: 535-538.

Takayama, S., A. Isogai. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.,* **56**: 467-489.

Takuno, S., R. Fujimoto, T. Sugimura, K. Sato, S. Okamoto, S. L. Zhang, T. Nishio. 2007. Effects of recombination on hitchhiking diversity in the Brassica self-incompatibility locus complex. *Genetics,* **177**: 949-958.

Tarutani, Y., H. Shiba, M. Iwano, T. Kakizaki, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai, S. Takayama. 2010. Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility. *Nature,* **466**: 983-986.

Thompson, K. F., J. P. Taylor. 1966. Non-linear dominance relationships between *S*-alleles. *Heredity,* **21**: 345-362.

Watanabe. M, A. Ito, Y. Takada, C. Ninomiya, T. Kakizaki, T. Takahata, K. Hatakeyama, K. Hinata, G. Suzuki, T. Takasaki, Y. Satta, H. Shiba, *S.* Takayama, A. Isogai. 2000. Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica*

*campestris (*syn. *rapa)* L.. *FEBS Lett.,* **473**: 139-144.
Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen, J. C. Carrington. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.,* **2**: E104.
Zilberman, D., X. Cao, S. E. Jacobsen. 2003. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science,* **299**: 716-719.

Dominant/recessive Relationship in Male Determinant Gene of Self-incompatibility in Brassica

Ryo FUJIMOTO[1]*, Takahiro KAWANABE[2], Taku SASAKI[3] and Keiichi OKAZAKI[1]

(Received July 4, 2011)

Summary

Self-incompatibility in Brassica is determined by the *S* specific interaction between SRK (*S* receptor kinase) and SP11/SCR (*S* locus rotein 11/ *S* locus cysteine rich), which is expressed from the *S* locus. As the self-incompatibility in Brassica is sporophytically controlled, the phenotype of the pollen is determined by the genotype of the plant, from which the pollen is derived. When there is a dominant/recessive relationship between *SP11/SCR* alleles, the expression of the recessive *SP11/SCR* is suppressed. This suppression is caused by DNA methylation of the promoter region of the recessive *SP11/SCR* alleles, which is directed by small RNAs expressed from the *S* locus of the dominant *S* haplotype, which has sequence similarity to the promoter region of the recessive *SP11/SCR* allele.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 64(1):17-26, 2011

Key words : Self-incompatibility, Brassicaceae, *S* locus, F_1 hybrid breeding, epigenetics

[1]*Graduate School of Science and Technology, Niigata University

[2] Watanabe Seed Co., Ltd.

[3] Gregor Mendel Institute