

氏 名(本籍)	おが 岡	もと 本	しゅん 俊	すけ 介
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 9 1 号			
学位授与年月日	平 成 1 9 年 3 月 2 7 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	アブラナ科植物における異質倍数体種の自家和合性に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	西 尾	剛
	(副 査)	教 授	鳥 山	欽 哉
		教 授	前	忠 彦

論文内容要旨

緒言

被子植物の多くの種は、自殖による近交弱勢を防ぐ機構として、自家不和合性を有している。アブラナ科植物は、孢子体型自家不和合性を有し、*S* 複対立遺伝子により、自家不和合性の認識特異性を決定している。*Brassica rapa* (カブ、ハクサイ)、*Brassica oleracea* (キャベツ、ブロッコリー) を用いた研究から、*S* 遺伝子座には花粉の認識特異性を決定するタンパク質である SP11(*S* locus protein 11) と柱頭の認識特異性を決定するタンパク質 SRK(*S* receptor kinase)、また SRK のレセプタードメイン (*S* ドメイン) と相同性の高い SLG(*S* locus glycoprotein) の遺伝子が座乗している。これらは1つの遺伝子の様な挙動を示すため、*S* ハプロタイプと呼ばれている。*S* ハプロタイプは *B. rapa*, *B. oleracea* で約 50~100 種類存在すると推定されている。

S ハプロタイプは SLG, SRK の相同性により、Class I と Class II に分けることができ、Class II の *S* ハプロタイプは Class I の *S* ハプロタイプに対し、花粉側で劣性を示すことが知られている。SP11, SRK, SLG の塩基配列は *B. rapa*, *B. oleracea* で多数決定された。そのうち、相同性が非常に高く、種間で同じ認識特異性をもつ‘種間ペア’が存在することが明らかとなった。

古くからアブラナ科植物では‘Uの三角形’として、*B. rapa*(AA ゲノム), *Brassica nigra*(クロガラシ、BB ゲノム), *B. oleracea*(CC ゲノム)の基本ゲノム種と、それらから成立した異質倍数体(複二倍体)種である、*Brassica napus*(セイヨウナタネ、AACC ゲノム), *Brassica juncea*(カラシナ、AABB ゲノム), *Brassica carinata*(アビシニアカラシ BBCC ゲノム)の関係が明らかになっている(Figure 1)。基本ゲノム種は自家不和合性の機構を持つが、異質倍数体種は自家和合性を示す。しかし人為的に合成異質倍数体を作成すると、自家不和合性を示す。なぜ自家和合性を示すかは非常に興味深い点である。本研究では *Raphanus sativus*(ダイコン)で SP11, SRK の塩基配列を決定し、‘属間’で SP11, SRK の相同性が高い *S* ハプロタイプを見出した。また *B. napus* の *S* ハプロタイプを同定するとともに、3品種の自家和合性原因を明らかにした。さらに、*B. juncea*, *B. carinata* の *S* ハプロタイプの同定と自家和合性の解析を行い、その結果から、自家和合性と異質倍数体種がどのように成立したかを考察した。

第1章 *Raphanus sativus* における *SP11*, *SRK* の解析

R. sativus の Class I S ハプロタイプホモ接合体 9 系統、Class II S ハプロタイプホモ接合体 1 系統の柱頭、葯から RNA を単離し、RT-PCR による増幅断片をクローニングし、*SP11* と *SRK* の塩基配列を決定した。決定した塩基配列からアミノ酸配列を推定し、既報の *B. rapa*, *B. oleracea* の *SP11*, *SRK* の推定アミノ酸配列と比較した。*B. rapa*, *B. oleracea* の種内でのアミノ酸配列の相同性が平均 30%であるが、*RsSP11-21* と *BrSP11-9* は 89.5%と非常に高い相同性を示した。また、*RsSRK-21* と *BrSRK-9* の間でも 91.0%と非常に高い相同性がみられた(Figure 2)。*R. sativus* S-21(*RsS-21*)は *B. rapa* S-9(*BrS-9*)と同じ祖先種の S ハプロタイプから成立したと考えられた(Figure 3)。*RsS-21* と *BrS-9* が同じ認識特異性を持つことは、後に Sato, Okamoto ら(2004)により示された。

第2章 *Brassica napus* における S ハプロタイプの解析と自家和合性原因の解明

(1) S ハプロタイプの同定

B. napus 45 品種を用い、*SLG*, *SRK* の PCR-RFLP 分析及び *SP11* の塩基配列分析を行い、Class I S ハプロタイプ 5 種類(*BnS-1*, -2, -3, -4, -5)、Class II S ハプロタイプ 2 種類(*BnS-6*, -7)を同定した。すべての品種に *BnS-6* がみられた(Table 1)。*SLG*, *SRK*, *SP11* の塩基配列を、既報の *B. rapa*, *B. oleracea* の *SLG*, *SRK*, *SP11* の塩基配列と比較したところ、非常に相同性の高い *SLG*, *SRK*, *SP11* が存在した(Table 2)。

(2) Westar における自家和合性原因の解明

B. napus の Westar 品種は、Class I の *BrS-47* と Class II の *B. oleracea* S-15(*BoS-15*)に由来すると考えられる、*BnS-1*; *BnS-6* を持っていた。Westar と、自家不和合性を示す人為的に作成した合成 *B. napus* との F₂ を用いた連鎖解析の結果、自家和合性は Westar の *BnS-1* に連鎖していた。Westar と *BrS-47*, *BoS-15* との相互交配の結果、Westar の自家和合性は花粉側に原因があることが考えられた(Table 3)。ノーザンブロット分析を行なうと *BnSP11-1*, *BnSP11-6* が共に転写していなかった(Figure 4)。*BnSP11-1* にはプロモーター領域-108 から上流に、3606bp の挿入がみられた(Figure 5)。Westar 以外の *BnS-1*; *BnS-6* を持つ品種においても、サザンブロット分析、ノーザンブロット分析で、挿入配列の存在が確認でき(Figure 6)、

BnSP11-1 は転写していなかった(Figure 7)。プロモーター領域では、タペート細胞での発現に必要なとされる領域内への 3.6kbp の挿入がみられた(Figure 8)。この挿入配列により、*BnSP11-1* は転写できなくなったと考えられた。

BnSP11-6 は *BoSP11-15* と 100%の相同性があり、塩基配列に違いがみられなかった。*BnSP11-6* は Class II の *SP11* であることから、Class I, Class II による優劣性によって転写が抑制されていることが考えられた。そこで Class I, Class II の組合せで合成 *B. napus* を作成し、*SP11* の転写を RT-PCR によりみたところ、Class II *SP11* の転写はすべて抑制されていた(Figure 9)。よって、*SP11* の優劣性は、対立遺伝子間でない同祖染色体間でも成立し、*BnSP11-6* は *BnSP11-1* に対し劣性を示し、転写が抑制されたことが考えられた。*BnSP11-1*, *BnSP11-6* の両方が転写していないことが、Westar の自家和合性の原因であると考えられた。

(3) Bronowski における自家和合性

BrS-21 と *BoS-15* 由来と考えられる *BnS-2*; *BnS-6* を持つ Bronowski では、*BrS-21*, *BoS-15* との相互交配の結果、*BnSRK-2* と *BnSP11-6* が機能していないことが考えられた(Table 3)。ノーザンブロット分析の結果、*BnSP11-6* は Bronowski においても転写が抑制されていた(Figure 10-A)。また *BnSRK-2* は *BrSRK-21* と塩基配列を比較すると、S ドメイン領域の 1-bp の挿入によりフレームシフトが起り、stop codon が生じたために機能を失ったと考えられた(Figure 10-B)。

(4) N344(Early Giant Rape 271-8)における自家和合性

BrS-8 と *BoS-15* 由来と考えられる *BnS-3*; *BnS-6* を持つ N344 では *BrS-8*, *BoS-15* との相互交配実験の結果、*BnSRK-3* と *BnSP11-6* が機能していないと推定された(Table 3)。ノーザンブロット分析の結果、*BnSP11-6* は転写していないことが分かった(Figure 11-A)。*BnSRK-3* の塩基配列の *BrSRK-8* との比較から、*BnSRK-3* には 7bp の欠失がみられ、フレームシフトが起り、stop codon が生じていたためから機能を失ったと考えられた(Figure 11-B)。

以上の結果から *B. napus* は、優劣関係にある S ハプロタイプを持つ組合せで、優性 S ハプロタイプの *SP11* あるいは *SRK* に存在する突然変異による機能喪失と、劣性の *SP11* が転写抑制されたことで、自家和合性になったと考えられた。優性 S ハプロタイプと劣性 S ハプロタイプの組合せでは、優性側の *SP11*, *SRK* どちらか

1 つに機能を失わせる突然変異が生じれば自家和合性になる。優劣を持つ *S* ハプロタイプの組合せの方が、自家和合性になりやすいものと推察された。

第3章 *Brassica juncea*, *Brassica carinata* における *S* ハプロタイプの同定と自家和合性の解析

(1) *B. juncea* における自家和合性

B. juncea 5 系統の *S* ハプロタイプを、*SLG* と *SP11* の塩基配列から決定した (Table 4)。5 系統すべてが、Class I と Class II の組合せであり、Class II の *B. juncea S-3* (*BjS-3*) を有していた。*BjSP11-3* は *BrSP11-29* と 100% の相同性があることから、*BjS-3* は *BrS-29* 由来であり、*BjS-1*, *BjS-2* は *B. nigra* 由来であると考えられた。しかし、*BjSLG-1* 及び *BjSLG-2* の由来となった *S* ハプロタイプを *B. nigra* の中で見出すことはできなかった。*Bj103*, *Bj106* と *BrS-29* ホモ接合体との相互交配を行なったところ、*Bj103*, *Bj106* の柱頭は *BrS-29* の花粉を拒絶したが、*Bj103*, *Bj106* の花粉は *BrS-29* の柱頭に対して、和合性を示した (Table 5)。ノーザンブロット分析を *B. juncea* 5 系統の葯で行ったところ、*BjSP11-3* の転写が確認できなかった (Figure 12)。RT-PCR により Class I の *SP11*, *SRK* の単離を試みたが、増幅産物を得ることができなかった。

B. juncea では、優劣関係にある *S* ハプロタイプの組合せであること、また劣性を示す *SP11* (*BjSP11-3*) の転写が抑制されていたことから、*B. napus* と同様の原因で自家和合性になったと推察した。

(2) *B. carinata* における自家和合性

B. carinata では *SLG* と *SP11* の塩基配列、PCR-RFLP のバンドパターンから、Class I *S* ハプロタイプ 1 種類 *BcS-1* と Class II *S* ハプロタイプ 4 種類 (*BcS-2*, -3, -4, -5) を同定した (Table 6)。*BcSLG-1* は *BoSLG-7* と 99% の相同性を、*BcSP11-2* は *BoSP11-2b* と 97.2%、*BcSP11-5* は *BoSP11-15* と 99% の相同性を示した。*BcSP11-3* は *B. nigra SP11-1* (*BniSP11-1*) と 98.8%、*BcSP11-4* は *BniSP11-2* と 99% の相同性を示した (Table 7)。*B. carinata* では *Bc103* 以外の系統に、3 種類の *S* ハプロタイプが存在した。*Bc101*, *Bc102* で、*BcSRK-1*, *BcSP11-1* の PCR による増幅を試みたが、増幅断片が得られなかった。*BoSP11-7*, *BoSLG-7* をプローブにし、サザンブロット分析を行ったところ *Bc101*, *Bc102* では、*BcSP11-1*, *BcSRK-1* と考えられるシグナルは検出できな

かった(Figure 13)。Bc101 と Bc103 と *BoS-2b*, *BoS-15* との相互交配の結果、Bc101, Bc103 の柱頭に *BoS-2b*, *BoS-15* を交配した場合は不和合性を示したが、Bc101, Bc103 の柱頭に *BoS-2b*, *BoS-15* を交配した場合は和合性を示した(Table 8)。Bc101, Bc102, Bc103 の葯でノーザンブロット分析を行ったところ、*BcSP11-2*, *BcSP11-3*, *BcSP11-4*, *BcSP11-5* の発現がすべてでみられなかった(Figure 14)。

Bc101, Bc102, Bc103 では *B. oleracea*, *B. nigra* 由来と考えられる Class II の *SP11* が両方発現していなかったことにより自家和合性になったと考えられた。*B. carinata* では、Bc103 系統以外で Class I の *BcSLG-1* が検出できたが、*BcSLG-1*, あるいはその周辺の領域がゲノム内に存在することで、Class II の *SP11* の発現が両方抑制された可能性が考えられた。

結語

アブラナ科植物では、*B. rapa*, *B. oleracea* 間で、同一の祖先 *S* ハプロタイプから分化したと考えられる‘種間ペア’が存在することが明らかとなっているが、*R. sativus* と *B. rapa* 間でも、同一の祖先と考えられる *S* ハプロタイプが存在した。

自家和合性を示すアブラナ科異質倍数体種でも *S* ハプロタイプを多数同定し、起源と考えられる基本ゲノム種の *S* ハプロタイプを多数見出した。

*B. napus*3 品種の自家和合性原因を明らかにしたが、その結果、異質倍数体種で自家和合性になるためには、優劣関係をもつ *S* ハプロタイプの組合せが重要と考えられた。*B. juncea* でも優劣関係をもつ *S* ハプロタイプであったため、*B. napus* と同じ原因で自家和合性になったと考えられた。また *B. carinata* では *B. oleracea*, *B. nigra* 由来の *SP11* が両方発現していないことが自家和合性の原因であることが明らかとなった。

異質倍数体種は、基本ゲノム種の集団が交わる領域で成立したと考えられている。しかし種間不和合性や雑種胚致死など生殖的障壁、染色体の倍化の必要性など、異質倍数体が生じる可能性は低く、集団内での個体数は少ないと考えられる。個体数が少ないとき（交配相手が不足する時）は、自家和合性の適応度が高いと考えられている。優劣関係をもつ *S* ハプロタイプの組合せでは、優性 *S* ハプロタイプに機能を失う突然変異が存在するだけで、即座に自家和合性を獲得できる。優劣関係のある *S* ハプロタイプの組合せは、異質倍数体種が成立するためには重要であったものと推察される(Figure 15)。

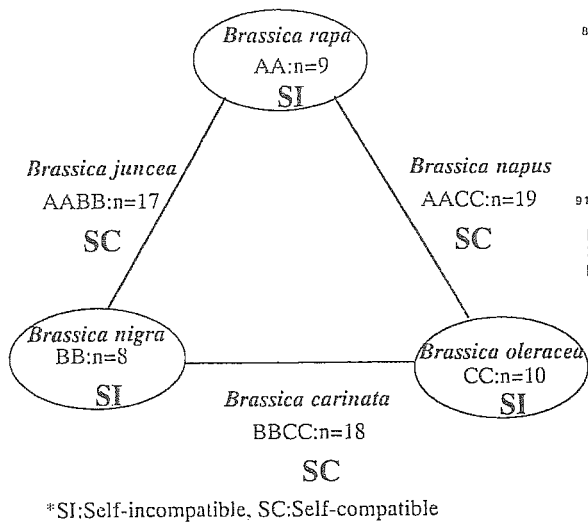


Figure 1 U's triangle indicating the relationships between *Brassica* genomes.

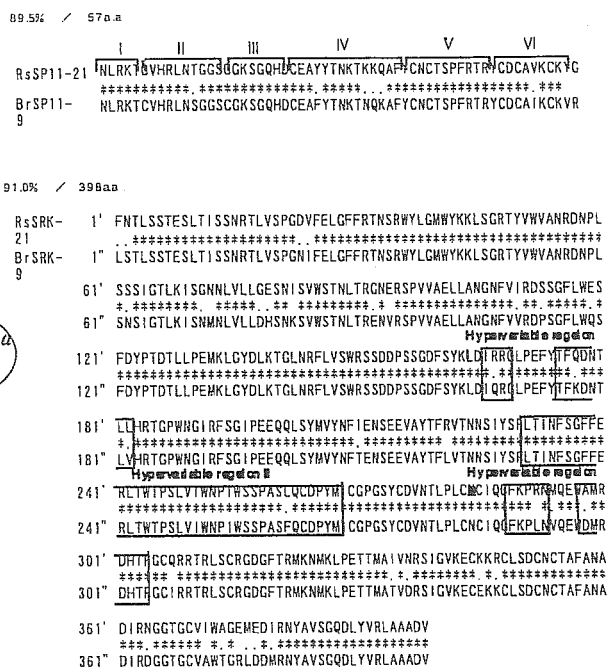


Figure 2 Similarity of SP11 and the S domain of SRK between S-21 in *R. sativus* and S-9 in *B. rapa*. Asterisk, identical amino acid residues, dots, amino acid residues of similar characteristics

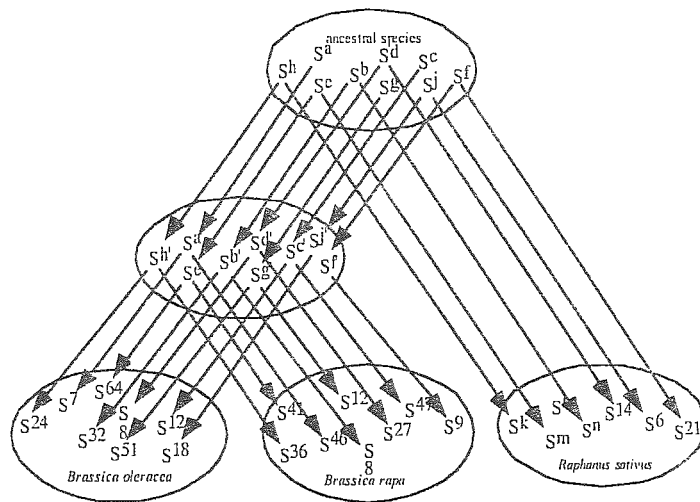


Figure 3 A model of S haplotypes evolution in *Raphanus* and *Brassica*.

Table 1. S haplotypes assigned to *Brassica napus* lines

Accession number	Cultivar names and description	Class I haplotype	Class II haplotype	Accession number	Cultivar names and description	Class I haplotype	Class II haplotype
N101	Yokkaichi-Kurodane-1	-	<i>BnS-6</i>	7 N134	Lembkes	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N102	Chosen-wase	-	<i>BnS-6</i>	7 N135	Mihonatane	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N106	Biennis	-	<i>BnS-6</i>	7 N136	Tohoku-18	-	<i>BnS-6</i> , 7
N108	anonymous	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N137	Isuzunatane	-	<i>BnS-6</i> , 7
N113	Norin-16	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N263	Willhelm-Burger a	<i>BnS-4</i>	<i>BnS-6</i>
N116	Yokkaichi-Kurodane-2	-	<i>BnS-6</i>	7 N264	Sensation Swede a	-	<i>BnS-6</i> , 7
N117	Wese-Chosen	-	<i>BnS-6</i>	7 N343	Early Giant Rape a	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N118	Karafuto	<i>BnS-2</i>	<i>BnS-6</i>	N344	Early Giant Rape a	<i>BnS-3</i>	<i>BnS-6</i>
N119	Sapporo	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N346	Bronowski	<i>BnS-2</i>	<i>BnS-6</i>
N120	Iwanarishu	-	<i>BnS-6</i>	7 N348	Vauaps CDA Oro	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N121	Hokkaidoshu	-	<i>BnS-6</i>	7 N349	Midas	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N122	Daichosen-33	-	<i>BnS-6</i>	7 N350	Zaphyr	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N123	Daichosen	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N351	Tower	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N124	Aomori-1	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N352	Oro	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N125	Tozanshu	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N353	Terget	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N126	Miyagi-Bansei	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N354	Turret	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N127	Banseina	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N474	wild in Ayancik	<i>BnS-5</i>	<i>BnS-6</i>
N128	Kaniv	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N476	Tribute	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N129	Hamburg-1	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N501	MS-1-2-1-6-14-1-2-1-6a	-	<i>BnS-6</i> , 7
N130	Ro-6	<i>BnS-2</i>	<i>BnS-6</i>	N502	Chisayanatane	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N131	Murasakinatane	-	<i>BnS-6</i>	7 N503	Hokuriku-23	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N132	Futsu-5	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>	N601	Westar	<i>BnS-1</i>	<i>BnS-6</i>
N133	Azuma	-	<i>BnS-6</i>	7			

a; rutabaga

Table 2. Sequence similarities of S-locus genes with reported sequences

S haplotypes	Homologous sequences	Nucleotide identity (%)	Amino-acid identity (%)
<i>BnS-1</i>	<i>BrSLG-47</i>	97.8	97.7
	<i>BoSLG-12</i>	96.0	93.9
<i>BnS-2</i>	<i>BrSLG-21</i>	99.6	99.5
	<i>BrSLG-34</i>	88.2	80.3
<i>BnS-3</i>	<i>BrSLG-8</i>	98.8	97.9
	<i>BrSLG-46</i>	96.5	94.8
<i>BnS-4</i>	<i>BoSLG-13</i>	97.1	96.3
	<i>BoSLG-12</i>	93.4	89.0
<i>BnS-5</i>	<i>BrSP11-32</i>	100	100
<i>BnS-6</i>	<i>BoSRK-15</i>	100	100
	<i>BrSRK-60</i>	97.4	95.6
<i>BnS-7</i>	<i>BrSP11-29</i>	100	100

Table 3. Reciprocal pollination tests between *B. napus* and *B. rapa* or *B. oleracea*

Stigma	Pollen donor									
	<i>B. napus</i>			<i>B. rapa</i>				<i>B. oleracea</i>		
	Westar	Bronowski	N344	<i>BrS-47</i>	<i>BrS-21</i>	<i>BrS-46</i>	<i>BrS-8</i>	<i>BrS-9</i>	<i>BoS-15</i>	<i>BoS-2b</i>
Westar	+			-	+	+			-	+
Bronowski		+		+	-	+			-	+
N344			+				+	+	-	+
<i>BrS-47</i>	+	+		-	+	+				
<i>BrS-21</i>	+	-		+	-	+				
<i>BrS-46</i>	+	+		+	+	-				
<i>BrS-8</i>							-	+		
<i>BrS-9</i>							+	-		
<i>BoS-15</i>	+	+	+						-	+
<i>BoS-2b</i>	+	+	+						+	-

* +; compatible, -; incompatible

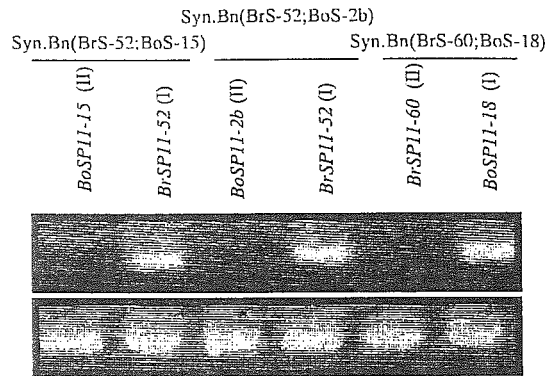


Figure 9
Analysis of gene expression of *SP11* in the anthers of artificially synthesized *B. napus* lines by RT-PCR. Class II *SP11*s were not amplified. The actin gene was used as a positive control.

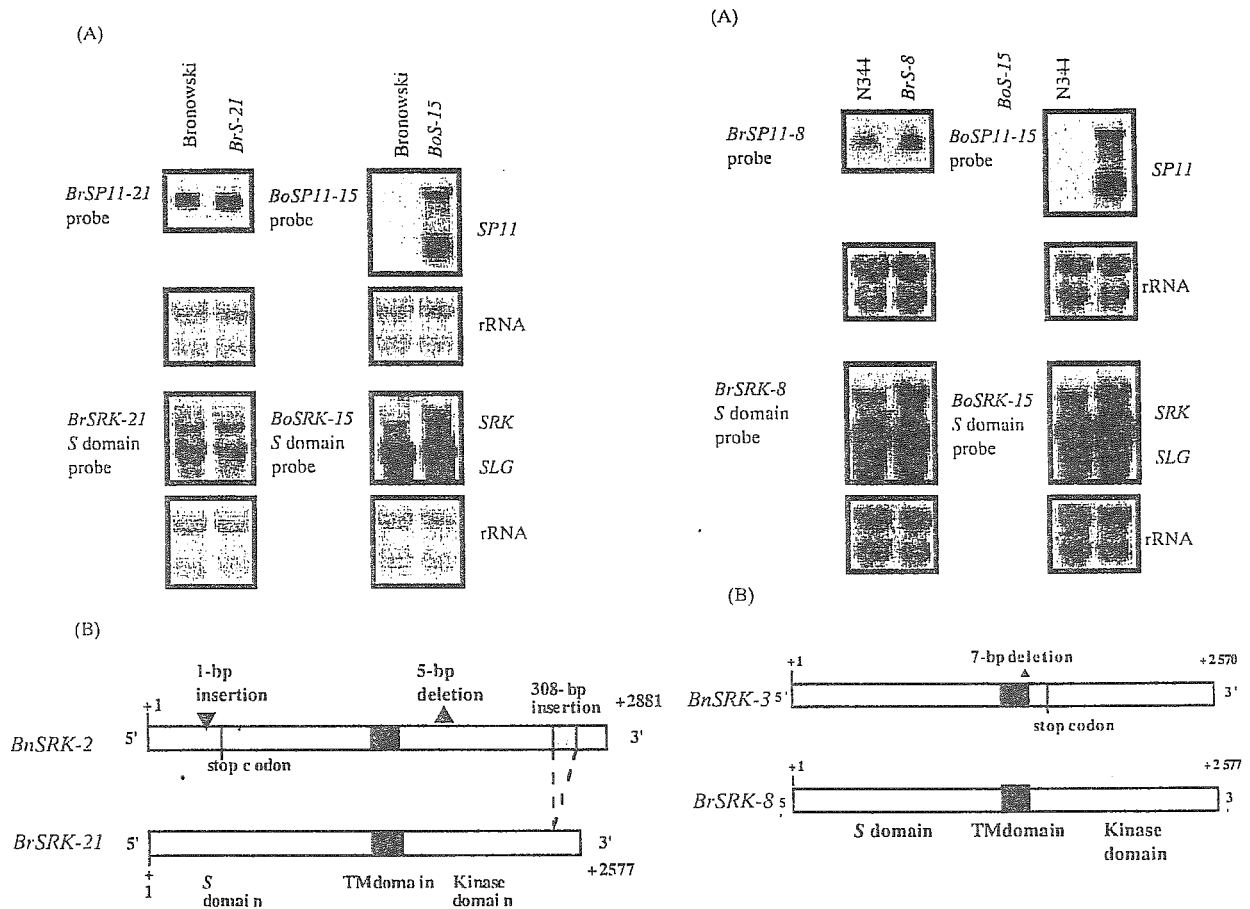


Figure 10
Gene expression analyses of *SP11* and *SRK* in 'Bronowski' and homozygotes of *BrS-21* in *B. rapa* and *BoS-15* in *B. oleracea* (A) and comparison of cDNA structure of *SRK*.
(A) Total RNAs isolated from the anthers and the stigmas were probed with cDNA clones of *BrSP11-21*, *BoSP11-15*, and the *S* domain of *BrSRK-21* and *BoSRK-15*. Anther and stigma RNAs of *BrS-21* and *BoS-15* homozygotes were used as positive controls.
(B) Comparison of cDNA sequences of *BnSRK-2* and *BrSRK-21*. Filled triangles indicate insertion or deletion. The gray box in *BnSRK-2* indicates insertion of DNA. A 1-bp insertion in the *S* domain of *BnSRK-2* brought about a frame shift. A 5-bp deletion and a 308-bp insertion were detected in the kinase domain of *BnSRK-2*.

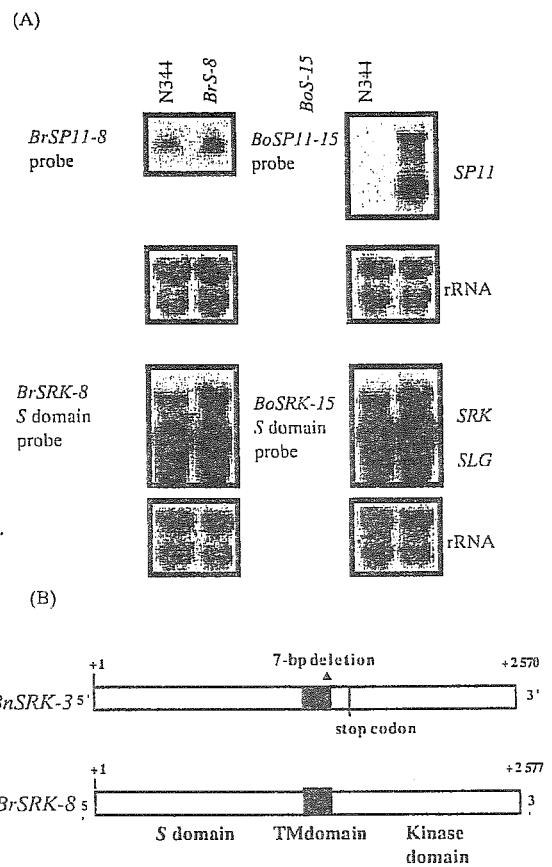


Figure 11
Gene expression analysis of *SP11* and *SRK* in N344 and homozygotes of *BrS-8* in *B. rapa* and *BoS-15* in *B. oleracea* (A) and the structure of *BnSRK-3* cDNA.
(A) Total RNA isolated from the anthers and the stigmas were probed with cDNA clones of *BrSP11-8* and *BoSP11-15* and the *S* domains of *BrSRK-8* and *BoSRK-15*. Anther and stigma RNAs of the *BrS-8* and *BoS-15* homozygotes were used as positive controls.
(B) Filled triangles indicate deletion of sequences. A 7-bp deletion in the second exon of *BnSRK-3* brought about premature stop codon.

Table 4. S haplotypes assigned to *Brassica juncea* lines

Lines	Class I S haplotype	Class II S haplotype
Bj103	<i>BjS-1</i>	<i>BjS-3</i>
Bj106	<i>BjS-2</i>	<i>BjS-3</i>
Bj109	<i>BjS-2</i>	<i>BjS-3</i>
Bj111	<i>BjS-2</i>	<i>BjS-3</i>
Bj129	<i>BjS-2</i>	<i>BjS-3</i>

Table 5. Reciprocal pollination tests between *B. juncea* and *B. rapa*

Pollen donor	<i>B. juncea</i>		<i>B. rapa</i>	
	Bj103	Bj106	<i>BrS-29</i>	<i>BrS-46</i>
Bj103	+	-	-	+
Bj106	-	+	-	+
<i>BrS-29</i>	+	+	-	+
<i>BrS-46</i>	+	+	+	-

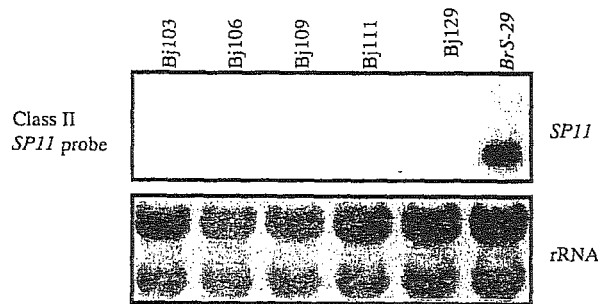


Figure 12

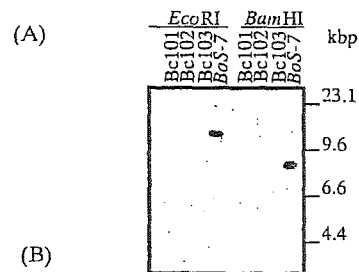
Northern blot analysis of *SP11* in five *B. juncea* lines. *BrSP11-29* were used as a probe. Anthers of *BrS-29* homozygotes were used as a positive control. No signals of *SP11*s were detected in the *B. juncea* lines. An equal loading of each sample was confirmed by staining rRNA with methylene blue.

Table 6. S haplotypes assigned to *Brassica carinata* lines.

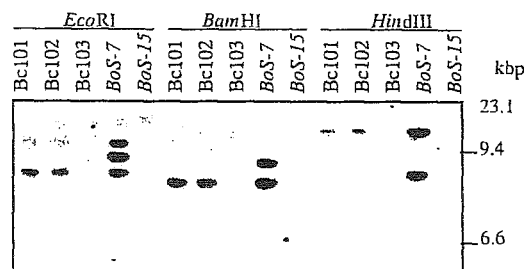
Lines	Class I S haplotype	Class II S haplotype
Bc101	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>
Bc102	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 4</i>
Bc103	-	<i>BcS-4, 5</i>
Bc105	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>
Bc106	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>
Bc108	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-4, 5</i>
Bc110	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-4, 5</i>
Bc111	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-4, 5</i>
Bc112	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>
Bc113	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>
Bc114	<i>BcS-1</i>	<i>BcS-2, 3</i>

Table 7. Similarities of S-locus genes in *B. carinata* to the genes in *B. oleracea* and *B. nigra*.

S-locus genes in <i>B. carinata</i>	Homologous sequences	Nucleotide identity (%)
<i>BcSLG-1</i>	<i>BoSLG-7</i>	99
<i>BcSP11-2</i>	<i>BoSP11-2b</i>	97.8
<i>BcSP11-3</i>	<i>BniSP11-1</i>	98.8
<i>BcSP11-4</i>	<i>BniSP11-2</i>	99
<i>BcSP11-5</i>	<i>BoSP11-15</i>	99



(A)



(B)

Figure 13

Southern blot analysis of class I *SP11* and *SRK* alleles in *B. carinata* lines having *BcS-1*.

(A) Genomic DNAs were digested with *EcoRI* and *BamHI*, and detected using a *BoSP11-7* probe. Signals of *BcSP11-1* was not detected in the three *B. carinata* lines.

(B) Genomic DNAs were digested with *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII*, and detected using the *BoSLG-7* probe. Signals of *BcSRK-1* was not detected in the three *B. carinata* lines.

Table 8. Reciprocal pollination tests between *B. carinata* and *B. oleracea*

Stigma	<i>B. carinata</i>		<i>B. oleracea</i>	
	Bc101	Bc103	BoS-2b	BoS-15
Bc101	+		-	+
Bc103		+	+	-
BoS-2b	+	+	-	+
BoS-15	+	+	+	-

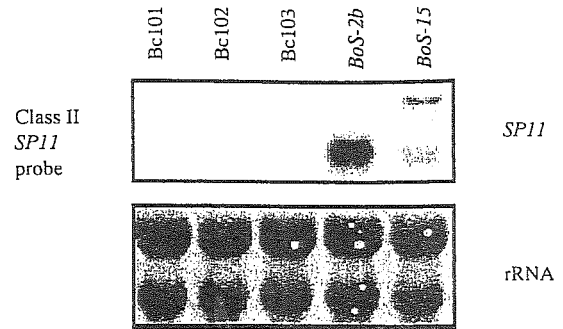


Figure 14 Northern blot analysis of *SP11* in three *B. carinata* lines. The *BcSP11-2*, *BcSP11-3*, *BcSP11-4*, *BcSP11-5* sequences were used as probes. Anthers of *BoS-2b* and *BoS-15* homozygotes were used as positive controls. No signals of *SP11*s were detected in the *B. carinata* lines. An equal loading of each sample was confirmed by staining rRNA with methylene blue.

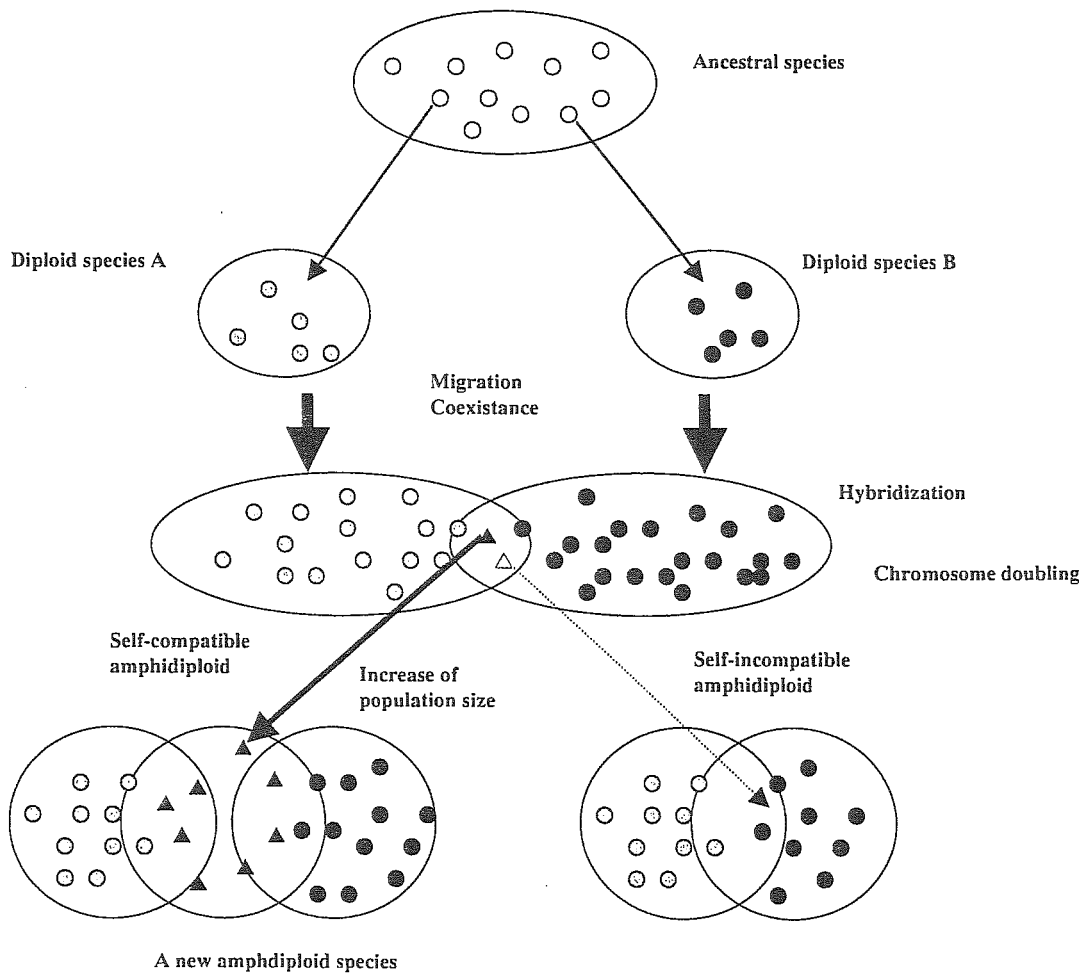


Figure 15 A model of evolution of *amphidiploid* species

論文審査結果要旨

アブラナ属の *Brassica rapa* は A ゲノム, *B. nigra* は B ゲノム, *B. oleracea* は C ゲノムを持ち, 自家不和合性を示すが, それらのゲノムを併せ持つ *B. napus* (AC ゲノム), *B. juncea* (AB ゲノム), *B. carinata* (BC ゲノム) はいずれも自家和合性を示す。人為的に合成した複二倍体植物は自家不和合性を示すことから, *B. napus* などの複二倍体種の自家和合性の原因は, 古くから興味を持たれてきた。本研究は, *B. napus* などの複二倍体種の自家和合性の原因を解明するとともに, アブラナ属に近縁のダイコンの自家不和合性遺伝子の *SP11* と *SRK* の変異解析を行ったものである。

自家不和合性遺伝子の変異解析は, アブラナ属では進んでいるが, ダイコン (*Raphanus sativus*) ではほとんどなされていない。柱頭側の自己認識分子の *SRK* の 9 種類の複対立遺伝子と花粉側の自己認識分子である *SP11* の 10 種類の複対立遺伝子の塩基配列を決定し, *B. rapa* の S-9 ハプロタイプと極めて類似し, 同じ認識特異性を有する S ハプロタイプをダイコンで発見した。このことから, S ハプロタイプの分化はアブラナとダイコンの属分化以前に起っており, 各 S ハプロタイプがそれぞれの属に分配されたとする進化のモデルを提唱した。

セイヨウナタネ (*B. napus*) の主要品種である 'Westar' の自家和合性は, *SRK* 遺伝子の 1 塩基欠失によるフレームシフトにより柱頭側の認識機能が失われたことによると長年信じられてきたが, *SRK* 遺伝子は正常に機能しており, 柱頭は認識機能を保持していることを見出した。これに対し, 'Westar' の *SP11* 遺伝子は, プロモーター領域に 3.6kb の挿入があり, 転写していないことを明らかにした。3.6kb 挿入を持つ *SP11* の S ハプロタイプと異なるもう一方の S ハプロタイプは, 構造や機能が完全に正常であるものの, *SP11* が劣性であり, 3.6kb 挿入を持つ *SP11* により発現が抑制されていることを示した。

'Westar' と同じ S ハプロタイプを持つセイヨウナタネ品種が最も多いが, 他の品種の自家和合性機構も解明した。'Bronowski' の *SP11* は正常であるものの, 1bp の挿入により *SRK* がフレームシフトを起し, 自家和合性になっていることを明らかにした。N344 でも, *SP11* は正常であり, 7bp の欠失により *SRK* が機能喪失していることを証明した。

B. juncea では 3 種類の S ハプロタイプを見出し, *B. napus* と同様に優性と劣性の S ハプロタイプの組合せになっており, 劣性側の *SP11* が転写されていないことを明らかにした。*B. carinata* では 5 種類の S ハプロタイプを見出し, *SP11* が転写されていないことを示した。

以上のように本研究は, アブラナ科の複二倍体種の自家和合性の原因を解明し, 自家不和合性の観点からこれらの種の成立機構についての新たなモデルを提唱するとともに, 異なる属間での S ハプロタイプの分化機構を明らかにし, 自家不和合性の機構解明に大きく貢献した。よって審査員一同は本論文は博士 (農学) の学位を授与するに値する内容であると判定した。