

アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の解明

下里 裕子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座

(磯貝 彰 教授)

平成 14 年 1 月 8 日提出

所属 (主指導教官)	細胞間情報学講座 (磯貝 彰 教授)		
氏名	下里 裕子	提出	平成 14 年 1 月 8 日
題目	アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の解明		

植物の多くは、雌雄の生殖器官が同一の花にある両性花をつけるため、自家受精する確率が高いはずである。しかし、両性花植物の多くは自家不和合性機構を獲得することで自家受精を回避し、種の遺伝的多様性を維持してきたと推定されている。本研究で扱うアブラナ科植物の自家不和合性は、 S 遺伝子座の複対立遺伝子 ($S_1, S_2, \dots, S_n$) により制御されており、花粉と柱頭間で S 遺伝子の表現型が一致する場合に不和合性反応が起きる。このことは、 S 遺伝子座にコードされる花粉側と柱頭側の S 遺伝子産物の相互作用を介して、花粉の自他識別が行われていることを示唆している。なお、本科植物の自家不和合性は、花粉の S 遺伝子の表現型が孢子体 ($2n$) である花粉親の S 遺伝子型によって決定されることから、孢子体型自家不和合性に分類されている。

これまでの研究により、柱頭側の S 遺伝子産物として SLG (S -locus glycoprotein) と SRK (S -receptor kinase) が見いだされてきた。SLG は分泌型糖蛋白質、SRK は SLG と相同な配列を細胞外に有する受容体型キナーゼであり、共に柱頭表層の乳頭細胞で特異的に発現し、 S 遺伝子間で多型を示す。最近、形質転換体の解析から、SRK が単独で柱頭の S 遺伝子型を決定すること、SLG は何らかの機構により不和合性反応を強化することが示唆されたが、両因子の具体的な機能については不明確であった。さらに、一方の花粉側の S 遺伝子産物 (花粉側 S 因子) については、精力的な探索にもかかわらず、実体が明らかにされていなかった。そこで、本研究では、未同定である花粉側 S 因子の実体を解明すること、さらにそれを手掛かりに自家不和合性における自他識別機構を明らかにすることを目的とした。

第1章 花粉側 S 因子の同定

アブラナ科植物 *Brassica rapa* S_8S_{12} ヘテロ個体 (F_1) を自家受粉により展開した F_2 分離個体を材料に、FDD (Fluorescent Differential Display) 法を用いて、両 S 遺伝子間で多型を示す薬発現遺伝子の検索を行った。240 通りのプライマーの組み合わせで検索を行い、9 種類の候補遺伝子を見出すことに成功した。その中の一つ GPI は、SLG と相互作用することで見出された一群の蛋白質類 (PCP 類) と類似した蛋白質をコードしていることが判明したため、最有力候補として解析を進めた。PCP 類は、分泌型の低分子量塩基性蛋白質で、分子内に 8 つの Cys 残基を有するのが特徴である。 S_8 、 S_{12} 系統より同定した GPI の相同性は大変低いものであったが、Long-PCR 法や BAC

クローンの解析から、両系統の *GPI* が共に *SRK* と *SLG* 間に位置していることが示され、対立遺伝子の関係にあることが判明した。また、同時期に *S₀* 系統の *SRK/SLG* ゲノム領域の配列解析からも対立遺伝子の関係にある薬発現遺伝子 *SP11* (*S*-locus protein 11; Suzuki et al., 1999)が見出され、これら遺伝子が *S* 遺伝子座に普遍的に存在する (*SLG*, *SRK* に次ぐ) 第3の *S* 複対立遺伝子である可能性が示唆された (以下 *GPI* を *SP11* と称する)。

RNA ゲルブロット解析、*in situ* ハイブリダイゼーション解析から、*SP11* は薬のタペート細胞と花粉で特異的に発現していることが示された。胞子体であるタペート細胞における *SP11* の発現は、胞子型自家不和合性の特性を無理なく説明しうるものであった。

さらに、*SP11* の発現蛋白質を作製し、受粉に及ぼす影響を検定した。その結果、*SP11* を予め乳頭細胞に処理すると、和合花粉の吸水が *S* 遺伝子特異的に阻害されることが示され、*SP11* が花粉側 *S* 因子であることを直接的に証明することができた。

第2章 花粉側 *S* 因子 *SP11* の一次構造の決定

SP11 発現蛋白質に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、成熟花粉では *SP11* が花粉表層に局在することが明らかになった。そこで、免疫沈降法により花粉表層抽出物から *SP11* を単離した。MALDI-TOF-MS による分子量解析により、*SP11* が予想された部位でシグナルペプチドが除去された後、8つの Cys 残基がすべて分子内で S-S 結合を形成した (酸化型) モノマーとして存在していることが示された。更に、改良した生物検定法を用い、特定の S-S 結合を有する酸化型 *SP11* が、*S* 遺伝子特異的かつ濃度依存的に和合花粉の花粉管伸長を阻害することを示し、その一次構造を有する *SP11* が花粉側 *S* 因子の本体であることを明らかにした。

第3章 自家不和合性における自他識別機構の解明

SP11 と柱頭側 *S* 遺伝子産物との関係を明らかにするために、まず BIAcore を用いて、カイコで発現させた *SRK* の細胞外領域、あるいは柱頭より精製した *SLG* と *SP11* との相互作用を解析した。しかし、いずれも *SP11* に対し結合活性を示さなかった。そこで、*SP11* を ¹²⁵I で標識し、柱頭膜画分との結合を解析したところ、*SP11* が柱頭膜画分に *S* 遺伝子特異的に結合することが示され、Scatchard 解析の結果、高親和性と低親和性の2つの結合部位の存在が示唆された。さらに架橋実験から、*SP11* に対する高親和性の結合部位は約 115 kDa と 60 kDa の2種類の蛋白質で構成されていることが示唆され、それらが *SRK* と *SLG* であることが特異抗体を用いた免疫沈降実験により明らかとなった。なお、可溶性の *SLG* との分子量比較から、受容体を構成している *SLG* が何らかの翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。さらに、*in vitro* のリン酸化実験では、*SP11* が柱頭細胞膜上の *SRK* の自己リン酸化を *S* 遺伝子特異的に誘導することが証明された。

以上の解析を通じ、花粉表層に局在する *SP11* が柱頭膜上の *SRK/SLG* 受容体複合体と結合し *SRK* を活性化することで不和合性反応を誘起していること、このリガンド-受容体複合体間の結合が *S* 遺伝子特異的に起きることが花粉の自他識別の基本であることを明らかにした。

目次

序論	1
第1章 花粉側 S 因子の同定	16
1-1 序	17
1-2 材料及び方法	20
1-3 結果	28
1-4 考察	47
第2章 花粉側 S 因子 SP11 の一次構造の決定	52
2-1 序	53
2-2 材料及び方法	54
2-3 結果	60
2-4 考察	70
第3章 自家不和合性における自他認識機構の解明	74
3-1 序	75
3-2 材料及び方法	76
3-3 結果	83
3-4 考察	98
総括	105
謝辞	108
引用文献	109

序論

有性生殖は、生物に進化と多様性をもたらす上で非常に重要な役割を担ってきた。有性生殖のシステムにより、生物は異なる遺伝子を有する非自己との交配が可能となり、これにより種内の遺伝的多様性を維持してきた。そして遺伝的多様性は、変動する環境下における種の存続に大変有利に働いてきたと考えられている。

被子植物の 70% は、同一の花器官中に雌しべと雄しべを有する両性花であるため (Frankel and Gaul, 1977)、自家受粉する確率が極めて高い。自己の花粉とそのまま受精に至るとすると、植物は遺伝的多様性を生みだし、維持することはできない。そこで、両性花の多くは受粉から受精に至る過程で、自己の花粉を識別し、それを排除するための機構を独自に発達させてきた。それが自家不和合性と呼ばれる機構である。

自家不和合性では花粉が正常であるにもかかわらず、雌ずいにおいて自己の花粉の吸水や花粉管の発芽・伸長が特異的に阻害される。その結果自殖は回避され、異なる遺伝子を有する非自己との受精（他殖）が優先的に行われる。古典的な遺伝学的研究から、植物の自家不和合性における自他の識別反応は、基本的に 1 座位 (S 遺伝子座) の S 複対立遺伝子（以下、 S 遺伝子と称する）により支配されていることが示されてきた。すなわち、花粉と雌ずいの S 遺伝子の表現型が一致する場合に不和合性反応が誘起される (Bateman et al., 1955)。被子植物のおよそ半数以上の種が、この機構を有していると言われている (Fryxell, 1957)。しかし、各植物種が進化の過程で獲得してきた自家不和合性の分子機構は多種多様であることが示されてきている (Nettancourt, 2001)。

これまでの研究から自家不和合性は、花の形態や遺伝様式から幾つかのタイプに分類されている (図 1)。まず、花の形態から異形花型と同形花型に大別される。異形花型不和合性は、花の中の雄ずいと雌ずいの相対的な長さの違いが不和合性の表現型と連鎖しているタイプで、サクラソウ科、タデ科で認められる。一方、同形花型自家不和合性は、花の形態に差異は認めれないが、 S 遺伝子の表現型が一致した場合に不和合性となるタイプであり、花粉における S 遺伝子の発現様式の違いから、さらに配偶体型と胞子体型に分類されている (Heslop-Harrison, 1978; Hinata and Nishio, 1979)。まず、配偶体型自家不和合性

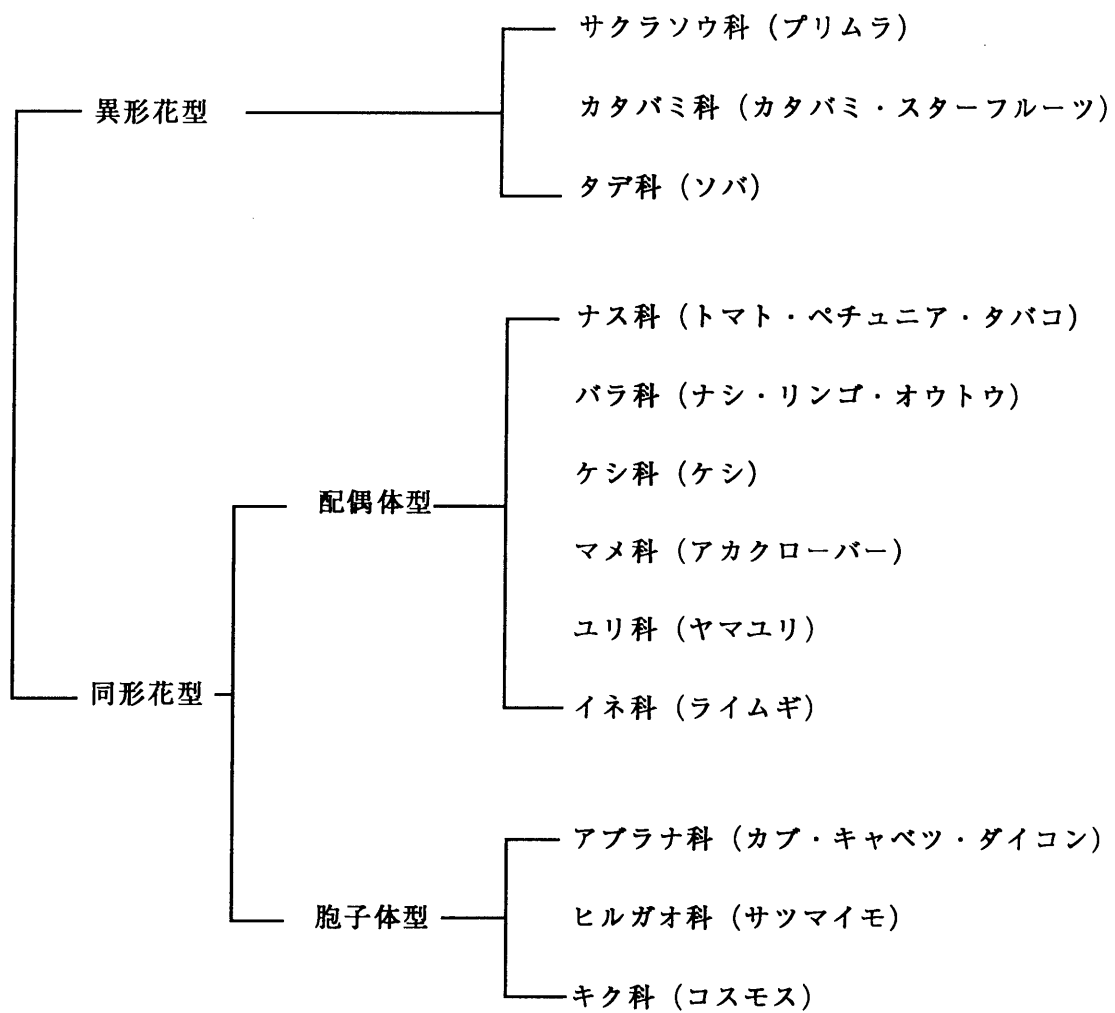


図1 自家不和合性の分類

は、バラ科、ナス科などで認められ（図1）、花粉の S 遺伝子の表現型が花粉 (n) の S 遺伝子型と一致するタイプである（図2A）。一方、孢子体型の自家不和合性は、花粉の S 遺伝子の表現型は花粉自身 (n) の S 遺伝子型ではなく、花粉親 ($2n$) の 2 つの S 遺伝子型によって決定される（図2B）。図2で示した例は、植物体の 2 つの S 遺伝子がすべて共優性を示す場合であるが、実際には花粉と柱頭で、各々 S 遺伝子間で優劣性が生ずる場合もあるため、和合・不和合の関係はより複雑である。

本論文で扱うアブラナ科植物は、孢子体型の自家不和合性を有し、これまでに野生集団の交配実験から、キャベツなどの *Brassica oleracea* では 50 種類、カブなどの *B. rapa* においては 30 種類余りの S 遺伝子が同定されてきている（Ockendon, 1985; Nou et al., 1993）。

アブラナ科植物の雌ずい先端の柱頭は、一層の乳頭細胞で覆われている。さらに、乳頭細胞の表面は、クチクラやペクチン-セルロース層で覆われており、容易には物質の行き来が出来ない構造となっている（Heslop-Harrison and Shivanna, 1977; Elleman and Dickinson, 1988, 1994）。花粉はこの乳頭細胞に受粉することになるが、その性質上、花粉は積極的に乳頭細胞へ接着し、そこから水の供給を得る必要がある。実際には、受粉した花粉と柱頭の接着面には foot と呼ばれる構造が形成され、これが花粉と乳頭細胞との間の接着や水の移動に関与していると考えられている（Elleman and Dickinson, 1990）。非自己の花粉が受粉（他家受粉）した場合、しばらく花粉の形態は変化しないが、20 分から 1 時間の後、急激な吸水が起こり膨潤して丸くなる。引き続き、花粉管が乳頭細胞に最も近い花粉孔より発芽し、foot を通って乳頭細胞へ侵入していく（図3）

（Elleman and Dickinson, 1994; Dickinson, 1995）。また、この時には乳頭細胞の foot 直下領域において、多数の分泌小胞が細胞膜と融合している様子や、細胞壁の外層が弛緩し、膨張している様子が観察される（Elleman, 1996）。この乳頭細胞の分泌小胞には、細胞壁の弛緩や花粉管の侵入・伸長を促進する物質が含まれている可能性が指摘されている。発芽した花粉管は、クチクラ層を突き抜け、弛緩した細胞壁外層と内層の間を伸長して乳頭細胞の基部まで行き、その後花柱の誘導組織の細胞間隙を経て胚珠に向かい、そこで受精が行われる（Stead et al., 1980; Elleman and Dickinson 1990; Elleman et al., 1992）。

一方、自己の花粉が受粉（自家受粉）した場合には、花粉と乳頭細胞間に foot

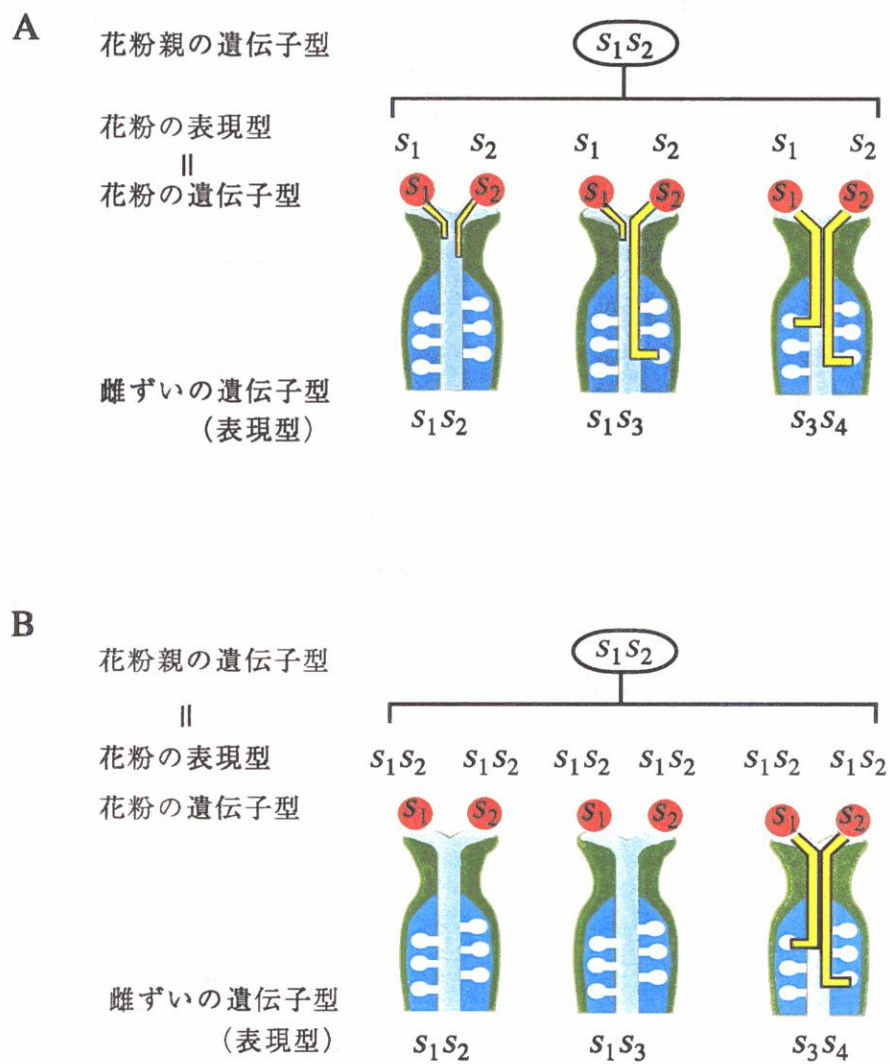
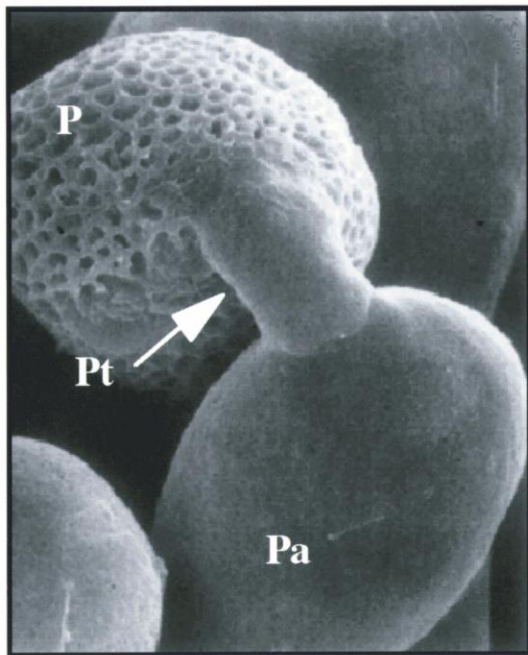
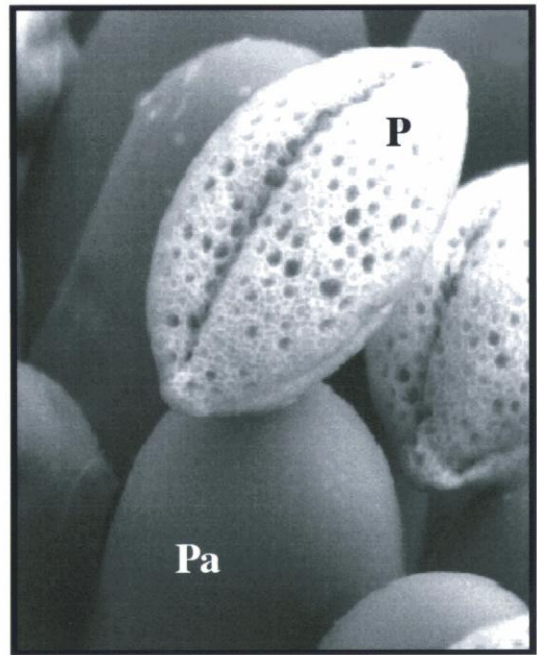


図 2 配偶体型自家不和合性(A)と胞子体型自家不和合性(B)

図では、花粉と雌ずいにおいて2つのS遺伝子が共優性を示す場合を示した。



他家受粉（和合）



自家受粉（不和合）

図3 アブラナ科植物の受粉時の走査電子顕微鏡像

P, pollen（花粉）；Pt, pollen tube（花粉管）；Pa, papilla cell（乳頭細胞）

の形成は認められるものの、その後の反応が抑制されることが知られている。一般に、花粉の乳頭細胞に対する接着力が、他家受粉の場合に比べて弱いことが指摘されており、また、接着後の花粉の吸水が起こらない様子（図3）、一部花粉が吸水し発芽しても花粉管が乳頭細胞に侵入できない様子が観察される（Dickinson, 1995）。この様な、自家受粉時に認められる受粉反応の変化は、花粉側ではなく、乳頭細胞側に何らかの変化が生じた結果であることが以下の実験により示唆されている。すなわち、自己花粉をしばらく置いた乳頭細胞の部位に、後から非自己の花粉を置いて花粉の吸水が認められないこと、逆に自己の乳頭細胞上に付着させて吸水できずにいる花粉を、非自己の乳頭細胞上に移すと吸水・発芽することが示されている（Dickinson, 1995）。

さて、この様な不和合性反応は、花粉と柱頭の *S* 遺伝子の表現型が一致した場合に誘導されることから、花粉と乳頭細胞上に存在する *S* 遺伝子産物を介して自他識別が行われていると推定される。そこで、これら *S* 遺伝子産物の実体解明が、自家不和合性の分子機構解明の鍵であると考えられ、今日に至るまで、精力的な探索が行われてきた。

まず最初に、免疫学的手法により *B. oleracea* の3種類の *S* 遺伝子ホモ植物体 (*S* 系統) の柱頭抽出物が解析され、*S* 系統特異的な蛋白質の存在が示された (Nasrallah and Wallace, 1967)。更に、柱頭抽出物中に *S* 系統毎に異なる等電点を持つ糖蛋白質が見出され、交配実験により *S* 遺伝子と行動を共にすることが判明したことから *S*-locus glycoprotein (SLG) と名付けられた (Nishio and Hinata, 1977; Hinata and Nishio, 1978; Okazaki and Hinata, 1984)。その後、*B. rapa* の *S*₈、*S*₉、*S*₁₂ 系統の柱頭より、それぞれ SLG が単離され、部分アミノ酸配列と主要糖鎖構造が明らかにされた (Takayama et al., 1986, 1987)。また、この蛋白質側からの解析と前後して、*B. oleracea* より SLG の cDNA がクローニングされた (Nasrallah et al., 1987)。これまでに、様々なアブラナ科植物から30以上もの SLG が単離されてきている (Trick and Flavell, 1989; Lalonde et al., 1989; Chen and Nasrallah, 1990; Yamakawa et al., 1994; Watanabe et al., 1994)。これらの解析から SLG は、分子量約 53 kDa 前後の分泌型の糖蛋白質であり、*S* 系統間で主要糖鎖の構造には相違が認められないが、アミノ酸配列の相同性は 64%~99.5% と変異が富んでいることが判明した (図4)。また、未熟な蕾段階の柱頭は自家

不和合性を示さず、開花数日前にようやく自己花粉を拒絶するようになることが知られているが、*SLG* は丁度その時期に合わせて乳頭細胞に特異的に発現してくることが示された (Nasrallah and Nasrallah, 1988; Kandasamy et al., 1989)。更に、*SLG* 蛋白質は花粉が接着する乳頭細胞の細胞壁中に蓄積していることが、抗 *SLG* 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析により示された (Kishi-Nishizawa et al., 1990)。これらの結果は、*SLG* の自家不和合性への関与を間接的に示唆するものであったが、直接的な証拠は得られていなかった。また、*SLG* には既知の蛋白質の何れとも相同性が認められなかったことから、この時点では自家不和合性における *SLG* の機能を推測することは出来なかった。

しばらくして、トウモロコシから受容体型キナーゼをコードする遺伝子 *ZmPK1* が植物において始めてクローニングされたが、そのキナーゼ分子の細胞外領域と *SLG* とが相同性を示すことが判明した (Walker and Zhang, 1990)。その後、*B. oleracea* や *B. rapa* の柱頭 cDNA ライブラリーやゲノムライブラリーから *ZmPK1* 様遺伝子の検索が行われ、*SLG* 様の配列を細胞外領域として持つ受容体型キナーゼとして、*SRK* (*S*-receptor kinase) が見出されてきた (Stein et al., 1991; Watanabe et al., 1994; Yamakawa et al., 1995)。RFLP 解析により *SRK* は、*S* 遺伝子と密接に連鎖していることが確認され、*SLG* 同様 *S* 遺伝子座にコードされていることが判明した (Stein et al., 1991; Watanabe et al., 1994)。また、RNA ゲルブロット解析から、*SRK* の発現は、開花数日前から柱頭特異的に認められ、*SLG* の発現様式と一致していたが、その発現量は 1/100 程度であることが示された (Goring and Rothstein, 1992)。

SLG 様の構造を持つ *SRK* の細胞外領域は *S*-domain と呼ばれるが、この部分の *S* 系統間でのアミノ酸配列の相同性は 66%~93.8%であり、非常に変異に富んでいることが示された (Hatakeyama et al., 1998)。細胞内領域は、セリン/スレオニン型のキナーゼをコードしているものと推定され、実際、大腸菌で発現させた細胞内領域の融合蛋白質がキナーゼ活性を示し、セリンおよびスレオニン残基が自己リン酸化されることが確認された (Goring and Rothstein, 1992)。更に *SRK* は、柱頭の細胞膜画分から界面活性剤によって溶出されることから、細胞膜上に存在していることが示唆された (Delorme et al., 1995)。

以上の知見から、柱頭側の受容体型キナーゼである *SRK* が自己の花粉を認識し、そのシグナルを乳頭細胞内にリン酸化反応で伝え、不和合性反応を誘起

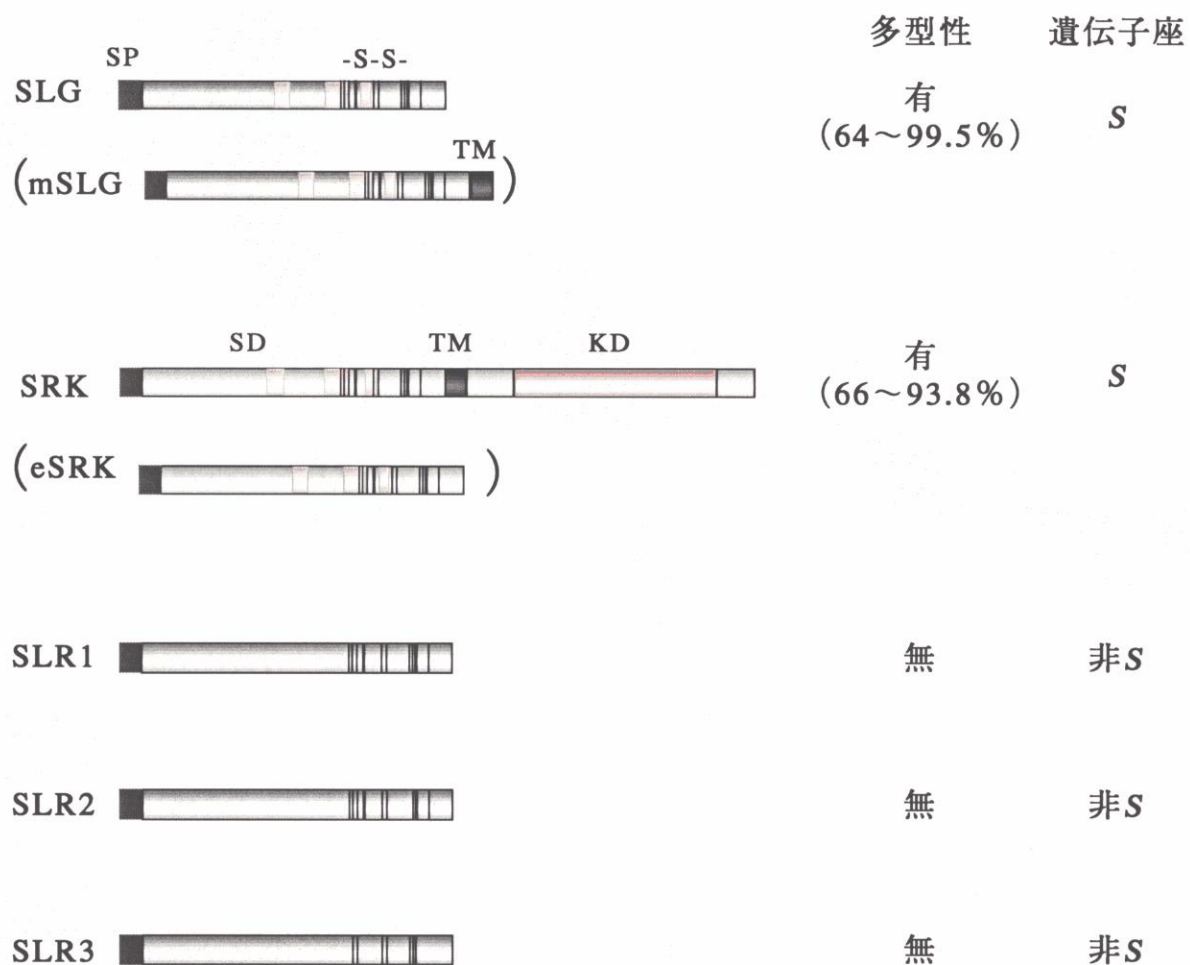


図4 SLG、SRK、SLR1、2、3蛋白質の一次構造の模式図

SLG及びSRKは、S遺伝子座にコードされておりS遺伝子間で多型を示す。特にS遺伝子間で変異に富む3つの可変領域を  で示した。カッコ内の数値は*B. rapa*のSLG及びSRKの細胞外領域(SD)のS遺伝子間でのアミノ酸配列の相同性を示す。SLR1, 2, 3は、SLGと類似した構造を有するが、S遺伝子座にはコードされておらず、アブラナ科植物内でアミノ酸配列が高度に保存されている。SLG, SRK, SLR1では、-S-S-S-の下に示した12個のcys残基が保存されているが、SLR2, SLR3ではこのcys残基の数が異なる。花粉劣性を示すClass-II系統(S₁₅, S₂)からは、膜貫通領域を持つmSLGが、S₃, S₆, S₉系統からはSRKの細胞外領域(S-domain)のみからなるeSRKの存在が示されている。SP, シグナルペプチド配列、TM, 膜貫通領域、KD, キナーゼドメインを示した。

しているモデルが広く考えられるようになった。また、基本的に SLG と SRK の S-domain は、他の S 遺伝子由来のものより同じ S 遺伝子由来の方が、より高い相同性を示す傾向が認められ、SLG と SRK が共に花粉側の S 遺伝子産物の受容に関与していることが推測された (Nasrallah and Nasrallah, 1993)。

これまでにクローニングされている SLG は、アミノ酸配列の相同性から class-I と class-II という 2 つのグループに分類されている (Nasrallah and Nasrallah, 1993)。同じ class 内での相同性は約 80~99.5%であるのに対し、class 間での相同性は 75%以下である (Nishio and Kusaba et al., 2000)。更に、class-II の SLG ゲノム構造は class-I と異なり、1 つのイントロンが存在することが示されている。また、一部の *B. oleracea* の class-II の SLG は、第 2 エキソンが膜貫通領域をコードしており、alternative splicing により分泌型の他に膜貫通領域を有する mSLG (membrane-anchored SLG) を生産することが見出されている (Tantikanjana et al., 1993; Cabrillac et al., 1999)。しかし、この mSLG は *B. rapa* の class-II の SLG では見出されておらず、class-II の SLG に共通する構造ではないことが示されている (Hatakeyama et al., 1998)。先に、アブラナ科植物の自家不和合性では、花粉と柱頭において各々 S 遺伝子間で優劣性が認められることに触れたが、class-II の SLG を有する S 遺伝子は class-I を有するものに対し、花粉において何故か劣性となることが示されている。現在では、花粉側において優性形質を示す S 遺伝子を class-I、劣性形質を示すものを class-II と言うように呼ばれている。

一方、SRK が alternative splicing により、SLG 様の可溶性蛋白質を生産することも幾つかの S 遺伝子で示されている (Stein et al., 1991; Giranton et al., 1995; Suzuki et al., 1996)。この蛋白質は eSRK (extracellular domain of SRK) と呼ばれ、細胞外領域である S-domain のみからなり、実際蛋白質に翻訳され細胞外に分泌されていることが *B. oleracea* の S_3 系統で確認されている (Giranton et al., 1995)。eSRK は、S-domain と膜貫通領域をコードする 2 つのエキソン間に存在する第 1 イントロンが切除されず、第 1 イントロン中に含まれる終止コドンと poly (A) 付加シグナルが代用されて翻訳されることが判明している。第 1 イントロン中の終止コドンと poly (A) 付加シグナルは、他の SRK にも高度に保存されていることから、eSRK の生産はすべての SRK に共通した現象である可能性が示唆されているが、その意義については明らかにされていない (Suzuki et al., 1995)。更に、柱頭抽出物から上記 S 遺伝子産物の他に、SLR1, 2, 3 (S-locus

related protein 1, 2, 3) と呼ばれる SLG と類似した構造の可溶性蛋白質が見出されている (Isogai, et al., 1988; Lalonde et al., 1989; Isogai et al., 1991; Boyes et al., 1991; Cock et al., 1995)。しかし、いずれも SLG や SRK とは異なり、S 遺伝子座にはコードされていないことが示されている。これらの内 SLR1 は、SLG と 60% 程度のアミノ酸配列の相同性を有する蛋白質で、発現時期や部位も SLG と極めて類似していた (図 4)。しかし、SLG が S 遺伝子間で多型を示すのに対し、SLR1 のアミノ酸配列はアブラナ科植物において極めて高度に保存されていることが判明し、SLR1 は受粉過程において何らかの根幹的な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、SLR1 のアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体が作出され、その植物体の乳頭細胞上では花粉の接着力が低下していることが示された (Luu et al., 1997)。この結果は、SLR1 が花粉と乳頭細胞間の接着という受粉時の基本的反応に関与していること、さらには、SLG/SRK といった自家不和合性に関わる分子が、SLR1 の様な受粉過程に直接関与する分子の中から進化してきた可能性を示唆するものであった。

さて、柱頭側の S 遺伝子産物の候補として SLG と SRK が見出されて以来、1) SLG と SRK の自家不和合性への関与の証明と、2) これらと相互作用する花粉側 S 遺伝子産物の探索が自家不和合性研究の焦点となってきた。

まず SLG と SRK の自家不和合性への関与については、これら遺伝子の発現や構造に異常をきたした自家和合性変異株の発見という形で、間接的な証拠が示されてきた。例えば、自家和合性の *B. napus* からクローニングされた SRK は、S-domain 中の 1 bp 欠失によりフレームシフトが生じており、短い異常な翻訳産物を生産していることが示された (Goring et al., 1993)。同様に、自家和合性の *B. oleracea* から、第 1、2 エキソンの欠失した SRK が見出されており (Nasrallah et al., 1994)、これらは SRK の自家不和合性への関与を示唆する例としてとらえられている。一方、*B. rapa* の自家和合性株からは、SRK の発現は正常であるものの、SLG 及び SLR1, 2 の発現量が減少しているものが見出された (Nasrallah et al., 1992)。この変異株における自家和合性の原因は、S 遺伝子座とは連鎖していない *scf1* と名付けられた劣性遺伝子によることが判明しており、SCF1 は分泌型糖蛋白質遺伝子に対する *trans* の転写因子である可能性が指摘されている。これは SLG の直接の変異ではないものの、自家不和合性に対する SLG の関与を示唆する例としてとらえられている。しかし、最近 SLG

の欠失や発現異常が認められるにも関わらず、正常な自家不和合性を示す *S* 系統の例が少数ながら見出され、*SLG* の自家不和合性への関与を疑問視する報告も成されている (Okazaki et al., 1999; Suzuki et al., 2000)。

SRK や *SLG* の自家不和合性への関与を直接的に証明するためには、形質転換法を用いた機能証明が不可欠である。しかし、実際の形質転換は、アブラナ科植物の再生効率や形質転換効率の低さと、導入遺伝子と内在性遺伝子間で派生する co-suppression の為、困難を極めた。まず、新しい *S* 遺伝子形質が付与されるかどうかを検証しようとする gain of function の実験が、*SRK* と *SLG* のそれぞれについて行われたが、得られた形質転換体は何れも期待に反して自家不和合性を示した。これは、co-suppression により、導入遺伝子に加え内在性の *SLG* 及び *SRK* の発現も抑制されてしまったためと考えられている (Toriyama et al., 1991; Conner et al., 1997)。それとは逆に、*B. rapa* へ *SLG* のアンチセンス遺伝子を導入する loss of function の実験も行われ、実際柱頭側の不和合性形質が消失した形質転換体を得られてきた (Shiba et al., 1995; Shiba et al., 2000)。ただし、この形質転換体では、配列の相同性から *SLG* に加え *SRK* の発現も抑制されていたために、*SLG* と *SRK* のどちらが自家不和合性に必要なのか、あるいは両者共に必要なのか、という点については結論が得られなかった。更に、*B. napus* を用いて、キナーゼ領域の活性中心のリジン残基をアラニン残基に置換したキナーゼ活性喪失型の *SRK* を発現させた形質転換体が作出された (Stahl et al., 1998)。得られた形質転換体の 1 つは、内在性の *SLG* 及び、*SRK* の発現量は wild type と同程度であったにもかかわらず、自家不和合性が弱くなっていた。この変化は、導入変異型 *SRK* による dominant negative な効果によると推定されており、*SRK* のキナーゼ活性が自家不和合性反応において必須であること、また *SRK* が多量体を形成して機能していることを示唆するものと考えられている。

それでは、柱頭側の *S* 遺伝子型は *SRK*、*SLG*、あるいは両者のいずれにより決定されるのであろうか。この点に関して示唆的な情報が、多数の *S* 遺伝子についての *SLG* と *SRK* のアミノ酸配列の比較解析より得られてきた。*SLG* と *SRK* の *S*-domain には、*S* 遺伝子間のアミノ酸配列の変異が特に高い 3 つの領域 (超可変領域) が存在し (図 4)、それらが *S* 遺伝子の特異性の決定に関与していると考えられてきた (Kusaba et al., 1997)。しかし近年、*SLG* の超可変領域のアミノ酸配列がほぼ一致するにも関わらず、相互に不和合性を示さない独立し

た *S* 系統が見出されてきた (Kusaba et al., 1997; Kusaba and Nishio, 1999)。例えば、独立した *S* 系統である *B. rapa* の S_8 および S_{46} 系統においては、SRK の *S*-domain は 85.6% 程度のアミノ酸配列の相同性を示し、超可変領域にも多くのアミノ酸置換が認められたが、SLG については 97.5% と高度に保存されており、超可変領域には変異は認められなかった。また、*B. oleracea* の S_{23} と S_{29} 系統においても、SRK の *S*-domain の相同性は 87.9% でかなりの相違が認められたが、SLG の相同性は 99.5% と僅か 2 残基の置換しか認められず、超可変領域は完全に保存されていた。逆に、相互に不和合を示し、同じ *S* 遺伝子型に分類される *B. oleracea* の S_2 と S_{2-b} 系統間、あるいは S_{13} と S_{13-b} 系統間において、SRK は確かに高度に保存されているものの、SLG の方は比較的変異に富んでいることが見出された (Kusaba et al., 2000)。特に、 S_{13} と S_{13-b} 系統由来の SRK は可変領域に 1 アミノ酸残基の相違のみしか認められなかったが、SLG については 6 カ所のアミノ酸残基の置換が認められた。以上の SLG 及び SRK のアミノ酸配列に関する解析結果は、柱頭側の *S* 遺伝子型の決定を、SLG ではなく SRK が担っている可能性を示唆するものであった。

最近、高崎らは class-I 系統の SRK あるいは SLG を、これらとは相同性の低い両遺伝子を持つ class-II 系統に導入することで、初めて co-suppression を回避した gain of function の実験に成功した (Takasaki et al., 2000)。その結果、SRK を単独で導入した形質転換体の柱頭が、新たな *S* 遺伝子形質を獲得することが示され、SRK が柱頭側の *S* 表現型を決定する因子であることが明かとなった。一方、SLG を単独で導入した形質転換体の柱頭は、新たな *S* 遺伝子形質を獲得できなかった (Takasaki et al., 1999; Takasaki et al., 2000)。しかし、SRK と同じ *S* 遺伝子由来の SLG を共発現した場合には、SRK を単独で発現させた場合よりも不和合性反応が強化されることが示され、SLG は、SRK による自己花粉の認識を何らかの機構により補強している可能性が示唆された (Takasaki et al., 2000)。しかし、別のグループが *B. napus* を用いて行った同様の形質転換実験では、SRK 単独で導入した個体と SRK 及び SLG を共に導入した個体とで、自家不和合性反応の程度に差は認められず、SLG の必要性についての明確な結論は得られていない (Silva et al., 2001)。

一方、上記の SLG 及び SRK についての変異体・形質転換体において、花粉

側の *S* 表現型には一切変化が認められなかったことから、花粉側の *S* 遺伝子形質を決定する因子（以下、花粉側 *S* 因子と称する）は、*SLG*、*SRK* 以外であることが示唆された。

さて、この未知の花粉側 *S* 因子は以下の特性を有すると考えられる。1) 不和合性は *S* 遺伝子座によって支配されることから、*S* 遺伝子座上すなわち、*SLG*、*SRK* 遺伝子の近傍にコードされていること、2) アブラナ科植物は孢子体型の自家不和合性を示すことから、花粉側 *S* 因子は減数分裂以前の花粉母細胞、もしくは孢子体である葯で生産される花粉表層蛋白質であること、3) *S* 遺伝子毎に異なったアミノ酸配列（多型）を有すること、4) 柱頭側 *S* 遺伝子産物である *SRK*（もしくは *SLG*）と相互作用すること、が推定される。これまでに世界各国で花粉側 *S* 因子の探索が精力的に進められてきたが、それらはいずれもこれらの特性の内のいくつかに着目して、遺伝子側あるいは蛋白質側から成されてきたものである。

遺伝子レベルで花粉側 *S* 因子を同定する試みは、まず *SLG*、*SRK* の近傍を遺伝子歩行し、葯において発現する遺伝子を検索する方法がとられた。最初に、*B. oleracea* の *S*₂ 系統より *SLG* の下流約 500 bp の位置にコードされ、葯で特異的に発現している *SLA* (*S*-locus anther) が見いだされた (Boyces and Nasrallah, 1995)。しかし、その後、レトロトランスポゾンにより *SLA* が破壊された *B. oleracea* の系統で自家不和合性を維持している例が見出され、*SLA* は花粉側 *S* 因子でないことが明かとなった (Pastuglia et al., 1997)。次に、*B. napus* W1 株から、*SLG*₉₁₀/*SRK*₉₁₀ 付近のゲノム領域をテンプレートとして葯の cDNA ライブラリーがスクリーニングされ、*SLL1*, *SLL2* (*S*-locus linked genes 1, 2) が見い出された (Yu et al., 1996)。しかし、*SLL1* は、*S* 遺伝子間の配列に多型が認められず、また *SLL2* は葯より柱頭で強く発現しており、どちらも花粉側 *S* 因子の要件を満たすものではなかった (Yu et al., 1996)。また、*B. oleracea* の *S*₆あるいは *S*₂ 系統では、*SLG* と *SRK* の物理距離が 200 kbp 以上も離れていることや (Boyces and Nasrallah, 1993)、それにも拘わらず F₂ 分離後代の 800 染色体においても両遺伝子間で組換えが認められないことが示され (Boyces et al., 1997)、遺伝子歩行やポジショナルクローニングによる花粉側 *S* 因子の同定は困難であると予想された。

花粉表層には exine と呼ばれる細胞骨格構造が存在し、その中はワックス、

低分子芳香族、蛋白質からなる tryphine と呼ばれる脂溶性物質で満たされている (Taylor and Heper, 1997)。この花粉表層の exine や tryphine の構成成分中には、花粉の柱頭への接着、吸水、花粉管の発芽伸長に關与する様々な物質が含まれてることが示されてきている (Preuss et al., 1993; Wolters-Arts et al., 1998)。また、花粉表層の蛋白質の多くは、胞子体である葯のタペート細胞に由来することが示されており、胞子体的な発現様式を示す花粉側 *S* 因子はこうした花粉表層蛋白質の一つである可能性が高いと考えられていた (Nettancourt, 1977)。

まず Doughty らは、花粉表層物質をシクロヘキサンを用いて抽出し、SLG との相互作用を指標に蛋白質側から花粉側 *S* 因子の同定を試みた。彼らは花粉表層物質を SLG と混合した後に等電点電気泳動に供する一種のゲルシフトアッセイを用い、SLG と相互作用する約 7 kDa の蛋白質を見出した (Doughty et al., 1993)。その後、この蛋白質は単離、クローニングされ、PCP-A1 (pollen coat protein class A1) と命名された (Doughty et al., 1998)。PCP-A1 は、分子内に 8 つのシステイン残基を有する塩基性の小型蛋白質で、その構造的特徴から抗菌性蛋白質である defensin 類と共通の family に属することが明らかとなった。しかし、PCP-A1 の発現が配偶体である花粉に特異的であること、さらに *S* 遺伝子と連鎖していないことが示され、花粉側 *S* 因子ではないことが明らかとなった (Doughty et al., 1998)。また、DNA ゲルブロット解析により *B. oleracea* のゲノム中には、PCP-A1 様の蛋白質をコードする遺伝子が 30~40 個程度存在し、family [PCP (pollen coat protein) family と命名] を形成していることが示されたが、その中で *S* 遺伝子と連鎖しているものは確認されなかった (Stanchev et al., 1996)。筆者の研究室においても、BIAcore 装置を用いて SLG や SLR1 と相互作用する花粉表層蛋白質が多種類同定され、いずれも PCP family に属する塩基性の小型蛋白質であることが判明したが、*S* 遺伝子間で多型を示すものは見出されなかった (浅野, 1999; Takayama et al., 2000b)。

Stephenson らは、乳頭細胞を花粉表層物質で予め処理すると、非自己の (和合) 花粉の吸水が *S* 遺伝子特異的に阻害されることを見出した (Stephenson et al., 1997)。さらに、この花粉の吸水阻害反応をバイオアッセイ系に利用し、花粉表層物質の逆相分配系 HPLC による分画の 1 つが、*S* 遺伝子特異的に花粉の吸水を阻害することを見出した (Stephenson et al., 1997)。この分画には、PCP-A1 を含む 10 kDa 以下の PCP 類が多く含まれていたことから、こうした PCP 類の中に真の花側 *S* 因子が存在することが期待されたが、存在量が極僅かである

ため活性本体の同定には至らなかった。

これまで述べてきた様に、花粉側 *S* 因子の探索は、遺伝子側あるいは蛋白質側から盛んに行われてきたにもかかわらず、いずれも本因子を特定するには至らなかった。しかし、自家不和合性における自他識別機構を明らかにするには、この未知の花粉側 *S* 因子の実体解明が必須であるのは明白であった。例えば、花粉側 *S* 因子の同定なくして、柱頭側の *SLG* や *SRK* の機能をさらに追求することは不可能であると思われた。そこで、本論文は花粉側 *S* 因子の実体を解明し、それを手掛かりに自家不和合性における自他識別機構を明らかにすることを目的とした。

本論文の第一章では、新たな手法を用いて花粉側 *S* 因子の探索を進め、有力な候補因子 (*SP11*: *S*-locus protein 11) を見出した。さらに、*SP11* が花粉側 *S* 因子であることを実験的に証明することに成功した。

次いで、第二章では、花粉表層に含まれる *SP11* 蛋白質の一次構造の解明を行った。さらに、本蛋白質を化学合成によりあるいは異種発現系により調製する方法を確立し、以下の生化学的解析の基盤を作った。

第三章では、調製した *SP11* 蛋白質を用いて、柱頭側因子 *SLG* および *SRK* との相互作用について生化学的解析を行った。最後に、得られた実験データに基づいて、アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構について新たな分子モデルを提唱した。

第 1 章

花粉側 S 因子の同定

1-1 序

本章においては、アブラナ科植物の自家不和合性における花粉側 *S* 因子の同定を目的として、新たな手法を用いて本因子の探索を展開した。

前述の通り、花粉側 *S* 因子の特性としては以下の4点が期待された。1) *S* 遺伝子座、すなわち *SLG*/*SRK* の近傍にコードされていること、2) 減数分裂以前の花粉母細胞、若しくは孢子体である葯で生産される花粉表層蛋白質であること、3) *S* 系統間で多型性を示すこと、4) *SRK* 若しくは *SLG* と相互作用することである。花粉側 *S* 因子の探索は、これらの要件に着目して進められてきたが、これまでは主として *SLG*, *SRK* のゲノム近傍領域の中から葯において発現する遺伝子を検索する方法、あるいは、花粉表層蛋白質の中から *SLG* と相互作用する蛋白質を探索する方法が用いられてきた。しかし、いずれの方法も成功せず、花粉側 *S* 因子は未解明のままであった。

そこで、当研究室の竹原は、蛍光ディファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display: FDD) 法を用いて、*S* 系統間で多型を示す葯発現遺伝子を探索するという新たな手法で花粉側 *S* 因子の探索を開始した (図 1-1) (竹原, 1997)。FDD 法は、一般に発現量の変動する遺伝子を網羅的に単離する方法として利用されているが、竹原はこの方法を系統間における発現遺伝子の多型の検出に応用した。

材料は *B.rapa* の S_8S_{12} ヘテロ個体を自家受粉して展開した F_2 分離個体の中から S_8 および S_{12} ホモ系統株を選別して用いた。上記 2) の要件に基づき、花粉側 *S* 因子が発現していると思われる開花 10 日前から開花前日までの葯を集め、系統毎にバルク化 (Michelmore, 1991) した後、cDNA を調製した。このバルク化により *S* 遺伝子間以外の、いわゆる個体差から生じる SNPs (single nucleotide polymorphisms) 等の多型の検出を抑えることが出来た。この様にして調製した葯発現遺伝子の中から、上記 3) の要件に基づき、両 *S* 系統間で異なった塩基配列を有する遺伝子を FDD によって網羅的に探索した (1st FDD)。さらに、両 *S* 系統間で差異の認められた増幅遺伝子については、今度は F_2 分離個体毎に調製した cDNA を用いて FDD 解析を繰り返し、上記 1) の要件に着目して、すなわち *S* 遺伝子座との遺伝的連鎖に着目して絞り込みを行った (2nd FDD)。竹原は、240 のプライマーの組み合わせで FDD 解析を行い、合計 26 本の *S* 系統特異的な増幅遺伝子を検出した。これら遺伝子は、花粉側 *S* 因子としての要件で

ある 1) ~3) を全て満たす花粉側 S 因子の有力な候補遺伝子であった。

筆者は、竹原の仕事を引き継ぎ、FDD で得られた 26 本の候補遺伝子について、バンドのクローニングを行い、塩基配列を決定して花粉側 S 因子の絞り込むことから研究を開始した。

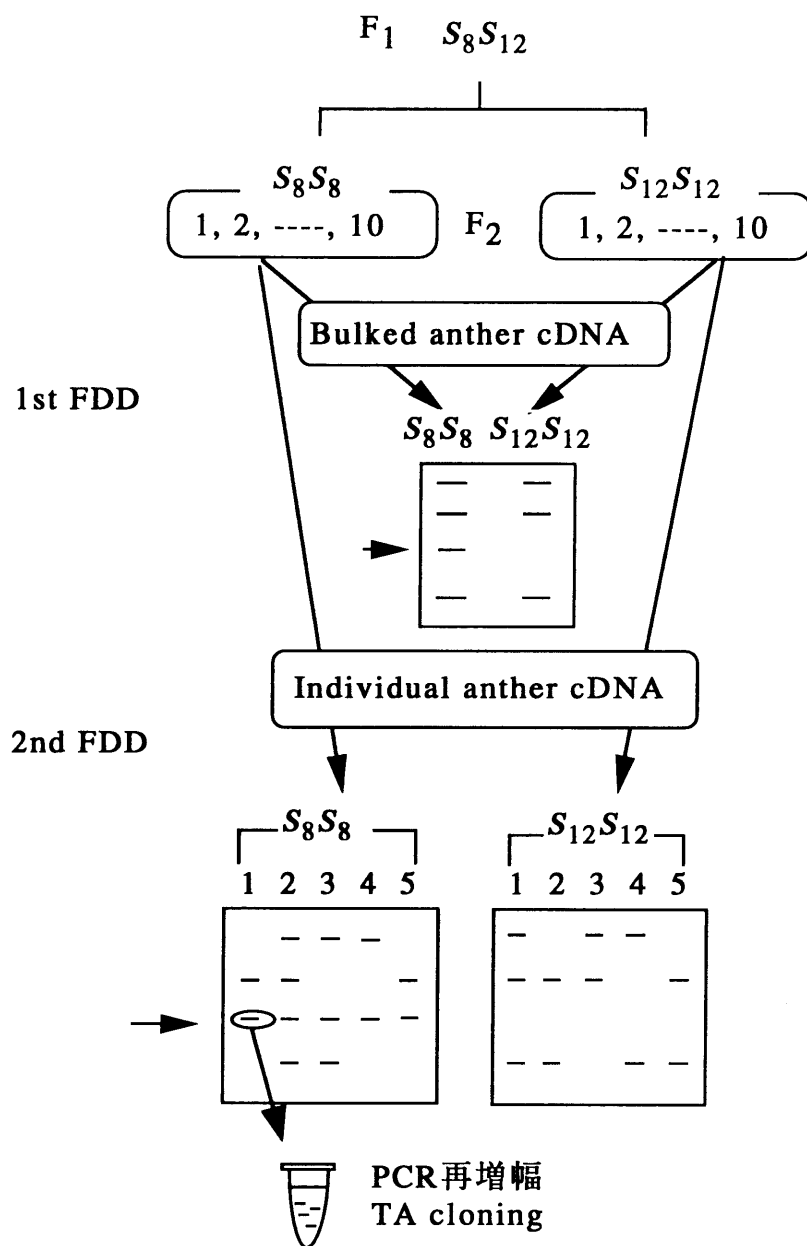


図 1 - 1 FDDを用いた花粉側S因子の検索法

B. rapa S₈S₁₂ヘテロ個体(F₁)を自家受粉して展開したF₂分離個体よりS₈、S₁₂ホモ系統株をそれぞれ10個体選抜して使用した。1段階目のFDDは、S系統毎バルク化したcDNAをテンプレートにFDD解析を行った。次に、バンドに差異の認められたprimerの組み合わせで、2段階目のFDDとして個体毎に調製したcDNAをテンプレートに同解析を繰り返した。S遺伝子座との連鎖が確認されたバンドについては、FDDゲルから切り出し、PCR再増幅後、TAクローニングを行い塩基配列を決定した。

1 - 2 材料及び方法

FDD (fluorescent differential display) 解析

葯 cDNA の調製

B. rapa S_8 および S_{12} ホモ系統を親とする F_1 個体 (S_8S_{12} ヘテロ体) 1 個体を蓄受粉により自家受粉して展開した F_2 分離個体から、 S_8 および S_{12} ホモ系統を選別した。 F_2 分離個体の S 遺伝子型は、 S_8 および S_{12} ホモ系統との交配実験、等電点電気泳動を用いた SLG_8 および SLG_{12} の検出、PCR-RFLP 法による SLG_8 および SLG_9 の識別、の 3 手法により検定し、少なくとも 2 手法で同一の判定の得られた個体のみを以下の実験に使用した。

各 S 系統より、花粉側 S 因子が発現している時期を含むと予想される 1~3 核期の葯 (蓄長約 1 mm~10 mm [開花前日]) を両 S 系統間で時期の偏りが無いように採集した。1 段階目の FDD 解析用としては、 S 系統毎に 10 個体分の葯をバルク化したものから、また 2 段階目の FDD 解析用としては、個体毎にまとめた葯から、各々 total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて調製した。次に、total RNA を DNase I (Gene Hunter) で処理してから 4 等分し、4 種類の 18 mer アンカー primer (5'-GT₁₅VN-3': V= mixture of G, C, and A; N= one of G, C, A and T) を用いて、Super Script II (GIBCO) により逆転写反応させ cDNA を調製した (Ito et al., 1994; Ito et al., 1995; 竹原, 1997)。

FDD 法

上記の方法で調製した cDNA を鋳型として用い、逆転写に使用した primer に XRITC (Rhodamine X isothiocyanate) ラベルした primer [5'-XRITC-GT₁₅VN-3' (TaKaRa)] と任意 primer [OPA-2~20, OPB-1~20 (OPERON), AP1~12, CMN-A00~09 (Common's Primer) のいずれか] (特に S 特異的バンドの増幅に使用した primer は下記に示した。表 1-1 参照。) を用いて PCR 増幅を行った。電気泳動時には、変性ローディング色素液 (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.04% bromophenol blue) を加え、熱変性させてから泳動した。泳動は、変性アクリルアミドゲル (4.75% acrylamide, 0.25% bis-acrylamide, 6.8M urea, 89 mM boric acid, 89 mM Tris, 2 mM EDTA) により、泳動 buffer 1×TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) を用いて、300 V、3~4 時間泳動した。サンプルマーカ (PRISM GENESCAN-500 ROX, ABI) も 1 本鎖に変性させて使用した。泳動後

のゲルは FM-BIO (TaKaRa) によりスキャニング後、FM-BIO Analysis ver. 6 (TaKaRa) により解析を行った。

FDD による S 特異的バンドの検出に使用した primer

Name	Sequence (5' to 3')
AP - 01	TGCTCCCATC
AP - 06	ATGGAGCAGC
OPA - 14	TCTGTGCTGG
OPB - 07	GGTGACGCAG
OPB - 08	GTCCACACGG
OPB - 09	TGGGGGACTC
OPB - 16	TTTGCCCGGA
OPB - 18	CCACAGCAGT
OPB - 19	ACCCCCGAAG
CMN - A00	ATCAGCGCACCA

FDD 増幅遺伝子のクローニング

FM-BIO で、バンドパターンをスキャニング後、目的のバンドを実寸大にプリントしたゲルイメージとゲル板を重ね合わせ、メスによって切りだした。ゲル断片は、熱変性後、FDD 解析に用いたのと同じ primer の組み合わせで再増幅を行った。ただし、アンカー primer には、XRITC ラベルしていないものを使用した。PCR 増幅後は、TA cloning kit (Invitrogen) を用いて pCR II vector にライゲーションを行った。ライゲーション反応物で TOP10' one shot competent cell (Invitrogen) の形質転換を行い、コロニー PCR によって目的の断片が挿入されたクローンを選択した。

シーケンス解析

PCR 産物から直接シーケンス解析する場合は、未反応の dNTPs や primer を除去する目的で、SAP (shrimp alkaline phosphatase)、Exo I (Exo nuclease I) 酵素処理 (37℃ 15 min, 80℃ 15 min) を行ったものをテンプレートとしてシーケンス反応に供した。

シーケンス反応は、Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing kit (PERKIN ELMER)、を用いて行った。シーケンスは、ABI PRISM™ 377 Sequence System (PERKIN ELMER)、若しくは ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PERKIN ELMER) を用いて解析した。

FDD ゲルブロット解析

クローニングされた DNA 断片が、FDD 解析において検出された目的バンドに対応するかどうかを検証するため、得られた DNA 断片をプローブとして用い、FDD 解析における増幅 DNA に対しゲルブロット解析を行った。

プローブの作製

プローブには、クローニングした遺伝子を PCR により再増幅し、DNA 回収用フィルター付き遠心チューブ SUPREC-02 (TaKaRa) を用い限外濾過精製を行ったものを使用した。得られた DNA 断片は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (1.85 Mbq, 50 μCi , Amersham Pharmacia) 存在下、Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0 (TaKaRa) を用いて ^{32}P 標識を行った。

FDD サザンハイブリダイゼーション

FDD 解析ゲルから、DNA 断片をメンブレン (Hybond-N+, Amersham) に 1~2 時間程度で転写させ、UV CHAMBER (BIO-RAD) を用いてメンブレンに固定した。

DNA を固定したメンブレンは、まず、Hybridization buffer (0.5 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 7% SDS) と熱変性させたサケ精子 DNA (終濃度 150 $\mu\text{g/ml}$) 中で 65°C、1 時間以上プレハイブリダイゼーションを行い、そこに熱変性させた ^{32}P 標識プローブ添加して、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンは、Wash buffer (2 $\times$ SSC, 0.1 % SDS) 中で 65°C、30 分間すすぎ、更にバックグラウンドが高い場合は (0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS) で洗浄した。解析は、イメージングプレートに感光させ、BAS2000 (Fuji) を用いて行った。

5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法

FDD 解析で用いたものと同じ各種成熟ステージの薬を集め、ISOGEN を用いて total RNA を抽出した。1 本鎖 cDNA の合成は、oligo(dT)primer と Superscript II を用いて行った。DNA tailing kit (Roche) を用い、上記 1 本鎖 cDNA の 5' 末端に poly (A) 若しくは poly (G) の付加を行った。そこへ、更に PCR によって Eco-Not アダプターの付加を行った。

EcoNot-T primer : 5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCATTTTTTTTTTTTTTTT-3'

EcoNot-C primer : 5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCACCCCCCCCCCCCCCCC-3'

上記の 5' 標識 cDNA を使用して、目的遺伝子の既知配列から設計した、特異的なアンチセンスプライマー (S_8 -*GPI*, 5'-CGATTTACAGTCACAAGAA-3', S_{12} -*GPI*, 5'-CGGAAAAGTAGAGTTGTTGTC-3') と、EcoNot primer (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCA-3') を用いた PCR 増幅によりクローニングを行った。

3'-RACE 法

5'-RACE 法と同様に調製した total RNA から、oligo (dT) primer と Superscript II により 1 本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型として、*GPI* の 5' 非コーディング領域とシグナルペプチド領域の配列から設計した primer (8*GPI*-1F: 5'-CTGCAAGTAAAAGAGAGAATCT-3'; 8*GPI*-5F: 5'-ATGAAATCTGCTATTTATGC-3') と EcoNot-T primer を用いて PCR 増幅により目的の遺伝子のクローニングを行った。

パルスフィールドゲルプロット解析

B. rapa S_8 および S_{12} 系統の若葉から、高分子量ゲノム DNA を精製し、アガロースプラグ (SeaKem GTG agarose; FMC) に包埋した (Liu and Whitter, 1994)。その後、制限酵素 buffer (TaKaRa) に 0.01% BSA を添加したものに浸し、*Mlu*I 制限酵素 (100 U) を加え、37°C で一晩処理した。泳動ゲルには、0.5×TBE (1×TBE: 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) で調製した 1% agarose (SeaKem GTG agarose; FMC) を用いた。泳動は、CHEF-DR II (BIO-RAD) 泳動装置を用い、0.5×TBE 中、以下の条件で泳動した。分子量マーカーとして DNA Size Standards-Yeast Chromosomal (Bio-Rad) を使用した。

泳動パラメーター

	Block 1	Block 2
Initial switch time	30 sec	6 sec
Final switch time	30 sec	6 sec
Volts/CMcm	6.0	6.0
Temperature	14°C	14°C
Run time	4.0 hrs	12 hrs
Included angle	120°	120°

泳動後、UV CHAMBER を用いてゲノムの細断片化を行い、Hybond-N+ (Amersham Pharmacia) メンブレンに DNA を転写させた。プローブの作製とシグナルの検出は、FDD ゲルブロテイングと同じ方法で行ったが、ハイブリバツファーには、5×SSC, 5×Denhardt's, 0.5% SDS を使用した。

LA-PCR 解析

B. rapa S_8 および S_{12} 系統の若葉より、ゲノム DNA を CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) により調製し、LA-PCR のテンプレートとして使用した。

GPI と *SRK*、*SLG* 間を増幅させるため、15 kbp 以上の増幅が可能な LA Taq (TaKaRa) を用いて PCR を行った。(使用した primer の位置は図 1-6、1-7、対応する primer の塩基配列は下記に記す。) 得られた PCR 産物の大きさが 10 kbp 以下である場合は、TA Cloning kit (invitrogen) を、10 kbp 上であった場合は Expand™ Cloning Kit (Roche) を用いてクローニングを行い、塩基配列を決定した。

LA-PCR に使用した primer

Name	Sequence (5' to 3')
SLG8-1R	TGTTCTTTCTTTCTTTCCCCCTCCCCTTGC
8GPI-1R	GTGATAAAAGATTCTCTCTTTTACTTGCAG
8GPI-1F	CTGCAAGTAAAAGAGAGAATCT
8GPI-2R	TTACTATCTGAACATGTGCATTGACCCCGCGGATATAATG
8GPI-2F	CATTATATCCGCGGGGTCAATGCACATGTTTCAGATAGTAA
SRK8-1R	CATGACAACGAAGACGAGCAAGGAGGTGTA
SLG8-1R	TGTTCTTTCTTTCTTTCCCCCTCCCCTTGC
SLG12-1R	CATAGTCGGATCCGTGTTTT
12GPI-1F	GACAACAACCTCTACTTTTCCGTTTCATTCC
SRK12-1R	GACAACAAAGGCGAGCACGAAAGAGAAGGT

BAC クローンのスクリーニング

B. rapa S_{12} 系統ゲノムの BAC ライブラリー (剣持, 1999) をナイロンメンブレンにスポットして作製した高密度メンブレンを用いて、 S_{12} -*GPI* の cDNA 配列をプローブにハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識から検出までの操作は Alkphos DIRECT (Amersham Pharmacia) を用い 65℃にて行った。

RNA ゲルプロット解析

B. rapa S₈ 系統より、下表の7つの発達段階に分類した蕾、及び開花後の花より葯と柱頭を採取した。

ステージ	蕾の長さ (mm)
1	～1
2	1～2
3	2～3
4	3～4
5	4～5
6	5～7
7	7～10
8	open flower

各組織からの total RNA の抽出方法は、「FDD 解析」葯 cDNA の調製参照 (p. 21)。約 20 μ g の total RNA をホルムアルデヒドゲル (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1.2% agarose, 0.66 M formaldehyde) 電気泳動により分離し、20 $\times$ SSC (0.33 M NaCl, 0.33 M sodium citrate, pH 7.0) を用いて Gene-screen plus メンブレン (Du Pont) へ転写した。転写したメンブレンは、UV クロスリンカー (GS Gene Linker, BIO-RAD) により RNA の固定を行った。プローブは、プローブの作製 (p. 22) と同じ方法で調製した、[α -³²P]dCTP 標識した *GPI* あるいは *BrPCP-A1* の cDNA クローンの PCR 増幅断片を使用した。尚、PCP-A1 は Doughty らが報告した *B. oleracea* の PCP-A1 と区別するため、BrPCP-A1 と記述する。

ハイブリダイゼーションは、hybridization buffer [5 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's, 0.5% SDS, 10.6 μ g/ml salmon testes DNA (SIGMA)] 中で 64 $^{\circ}$ C で一晩行った。その後、メンブレンを 2 $\times$ SSPE (20 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA) 中で 5 分間、2 $\times$ SSPE, 2% SDS 中で 30 分間振とうすることで洗浄した。バックグラウンドが高い場合は、更に 2 $\times$ SSPE, 2% SDS での洗浄を繰り返した。シグナル検出は、BAS2000 システムを用いて行った。

In situ ハイブリダイゼーション解析

B. rapa S₈ 系統の葯組織を、4% paraformaldehyde, 0.25% glutaraldehyde を含む 50 mM phosphate (pH 7.2) buffer で固定し、Paraplast (Sigma) に包埋した。次に、ミクロトーム (HM640E, microm) を用いて 10 μ m の厚さの切片を作製してハイブリダイゼーションに使用した。*GPI* 及び、*BrPCP-A1* の cDNA 翻訳

領域を、pBS SK⁺ vector の SP6/T7 RNA promoter の下流にアンチセンス又はセンス方向に挿入し、標識プローブの作製に使用した。RNA プローブは、DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Roche Diagnostics) により digoxigenin 標識して、使用した。

ハイブリダイゼーションは、熱変性させたプローブを含む 1 ml の hybridization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1×Denhardt's, 300 mM NaCl, 50% formamide, 10% dextran sulphate, 1 mg/ml salmon sperm DNA) 中で、37℃、一晩行った。次に、TBST buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で洗浄後、Superblock in TBS (PIERCE) で室温、30 分間ブロッキングを行った。二次抗体として 1% BSA を含む TBST により 100 倍希釈した AP-Anti Dig () 溶液中で 1 時間、室温で反応させた。その後、TBST により 5 分間毎、3 回洗浄し、BCIP/NBT (Sigma) を用いて発色させた。観察は Axiophoto 2 (Zeiss) を使用した。

SP11 発現蛋白質の作製

SP11 融合蛋白質の発現ベクターの構築

SP11 蛋白質は、N 末端に疎水性の分泌シグナルを有することが推定される。しかし、その切断位置についての知見が得られていなかったため、PCP-A1 等の PCP 類の多くがピログルタミンサン残基を N 末端とすることを参考に、まずは SP11 間で保存されている 20 アミノ酸残基目に当たるグルタミン酸残基以降の部分 GST 融合蛋白質として発現させることにした。*S₈-SP11* および *S₉-SP11* の cDNA 断片より、シグナル配列を除き、制限酵素サイト *EcoRI* と *XhoI* (TaKaRa) を付加するよう設計した primer (forward 5'-AGGAATTCCATCGAAGGTCGTCAACAAAATTCCAGTGC-3'; reverse 5'-GGGCTCGAGTCTATCTAACTTTGCATTTA-3') を用いて、PCR によりコーディング領域を増幅し、発現ベクターである pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia) の *EcoRI* と *XhoI* サイトに導入した。

SP11 組み換え蛋白質の発現と精製

作製した発現 vector で、大腸菌株 BL21 (DE3) codon plus (Stratagene) を形質転換した。形質転換した大腸菌 1 コロニーを 2×YT 培地 (Tryptone 16 g/L, Yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L, Ampicillin 100 μg/ml) に植菌し、37℃で一晩振と

う培養した。この培養液を 2×YT 培地に 1/100 量植菌し、培養液の O.D.₆₀₀ が 0.5 付近に達するまで 30℃で振とう培養した。その後、終濃度が 0.2 mM になるように IPTG を添加し、更に 30℃で 3 時間振とう培養を続けた。培養終了後は、菌体を回収し、lysis buffer [B-PER (PIERCE), 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] で可溶化を行なった。遠心 (10000×g, 40 min) を行い可溶性画分と不溶性画分に分離し、可溶性画分を Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を用いて精製した。カラムに吸着後、1 U/μl factor Xa (Amersham Pharmacia) で室温、2 時間酵素処理を行い、SP11 蛋白質を GST より切断した。SP11 蛋白質の溶出は、TBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7.4) で行い、溶出後は Protein assay kit (BIO-RAD) を用いて蛋白質を定量した。溶出した SP11 は、C18 (ODS) カラム (218TP54, φ4.6 x 250 mm, Vydac) を用いた逆相分配系 HPLC に供して精製した。分画操作は、0.1% TFA で平衡化したカラムを、流速 1 ml/min でアセトニトリル濃度 32%までのグラジエント条件で行った。各分画の蛋白質は、シナピン酸マトリクス (10 mg/ml sinapic acid in 0.1% TFA, 33%アセトニトリル) 溶液と混合し、MALDI-TOF-MS (VoyagerTM Elite; PerSeptive Biosystems) によって分子量を確認した。

花粉の吸水を指標としたバイオアッセイ法

バイオアッセイ法は基本的に、Stephenson らの報告に従って行った (Stephenson et al., 1997)。まず、50 花分の葯をスライドガラスに広げ、37℃で処理することにより、pollen coat をスライドガラスに抽出した。この pollen coat に S₉-SP11 発現蛋白質 (0.06 μg) を混合し、マイクロマニピレーターを用いて乳頭細胞に塗布した。その上に、和合花粉を載せ、30 分～1 時間室温下に静置し、花粉の吸水を指標に和合、不和合を判断した。また、コントロールとしては、S₉-SP11 蛋白質の代わりに pollen coat に蒸留水を混合したものを用いた。

1 - 3 結果

S 系統特異的葯発現遺伝子類の解析

竹原は、240 プライマー組み合わせで 2 段階からなる FDD 解析を行い、26 本の S 遺伝子特異的な増幅バンドを見出した。さらに、これらのうち 13 本のバンドが同一の LTP (Lipid Transfer Protein) 様遺伝子に由来すること、また 2 本が同一の 60S-ribosomal protein 様遺伝子に由来することを明らかにした (竹原, 1997)。

筆者は、この実験を引継ぎ、残りの S 系統特異的バンドについて、FDD 解析の再現性を確認すると同時に、対応する遺伝子の解析を進めた。なお、遺伝子解析は、FDD ゲルから S 系統特異的バンドを切り出して DNA を回収し、PCR 法による再増幅を行った後、クローニングするという手順で進めた。その際、目的バンドに近接する非特異的なバンドの混入や、バンドとしては検出されない非蛍光標識のセンス鎖の混入を避けることは出来なかった。そこで、クローニングした遺伝子全てについて、目的のバンド由来のものであるかを以下の 2 つの方法で確認した。まず、クローニングした遺伝子断片を鋳型に FDD 解析を繰り返し、当該遺伝子が切り出したバンドと完全に同じ位置に蛍光バンドを与えることを確認した。また、クローニングした遺伝子をプローブに用い、FDD 解析ゲルに対してサザンブロット解析を行うことで、目的バンドが検出されることを確認した。

以上の解析の結果、26 本のバンドの内の 24 本に再現性が認められ、それらはクローニングされた DNA の塩基配列解析とサザンブロット解析の結果から、9 グループに分類された (表 1-1)。すなわち、これら S 系統特異的バンドは全て、9 つの遺伝子 (*GP1*~*GP9* と命名) に由来することが判明した。これら遺伝子は、葯において発現しており、 S_8 および S_{12} 系統間で多型を示し、調査した F_2 分離個体 (10 個体) において S 遺伝子座と連鎖していることから、いずれも花粉側 S 因子の有力な候補遺伝子であると考えられた。

各遺伝子から推定されるアミノ酸配列と相同性を示す蛋白質をデータベースより検索して表 1 に示した。*GP1* については、データベース検索からは相同性を示すものは見出されなかったが、SLG との相互作用が示された PCP 類と類似の蛋白質をコードしていることが判明したことから、花粉側因子の最有力候補として解析を進めた。なお、*GP2* がコードする LTP (Lipid Transfer Protein) 様

Group No.	Arbitrary Primer	Anchored primer	No. of Specific Bands		Homology
			S ₈	S ₁₂	
1.	AP-02	GT ₁₅ V A	1		None* (PCPs)
		GT ₁₅ V C	3	2	
2.	AP-06	GT ₁₅ V A	1	1	Lipid transfer protein (<i>A. thaliana</i> chr1. F4N21, 24.1 Mbp)
		GT ₁₅ V T	3	3	
3.	OPA-14	GT ₁₅ V C	1		G protein (<i>A. thaliana</i> chr3. F15G16)
4.	OPB-07	GT ₁₅ V A	1	1	60S ribosomal protein (<i>A. thaliana</i> chr1. F26F24, 8.3 Mbp)
5.	OPB-08	GT ₁₅ V C	1		Poly(A) binding protein (<i>A. thaliana</i> chr1. T22J18, 8 Mbp)
6.	OPB-09	GT ₁₅ V G		1	None
7.	OPB-18	GT ₁₅ V T	1	1	Hypothetical protein (<i>A. thaliana</i> chr1. F22H5, 27.5 Mbp)
8.	OPB-19	GT ₁₅ V G		1	Hypothetical protein (<i>A. thaliana</i> chr1. T27F4, 24 Mbp)
		GT ₁₅ V C		1	
9.	CMN-A00	GT ₁₅ V T	1		None

表1-1 FDDにより見出されたS遺伝子間で多型の認められた薬発現遺伝子類

データベースとの相同性検索の結果見出された*A. thaliana*の相同遺伝子をHomology欄に示した。括弧内には当該遺伝子がコードされている染色体番号、BACのクローン番号、その染色体上での距離を示した。*, *Group1*遺伝子 (GPI) は相同性検索では相同性遺伝子は見出されなかったが、*B. oleracea*の花粉表層蛋白質PCP類と類似の性状を示した (本文参照)。

蛋白質も、8つのシステイン残基を持つ小型の塩基性蛋白質であるという点で広義のPCP類に属すると判断され、有力候補として解析を進めた。しかし、GP2は S_8 , S_9 , S_{12} 系統間でアミノ酸配列の相同性が96~98%と高度に保存されていることが判明し、花粉側S因子である可能性は低いと判断された(下里, 1999)。

S系統特異的葯発現遺伝子GP1のクローニングと塩基配列解析

GP1は、まずFDD解析において、 S_8 系統に特異的な180bpの増幅遺伝子断片として見出された(以後 S_8 系統由来のGP1を S_8 -GP1と略記する、図1-2)。この遺伝子断片をクローニングし、塩基配列を決定した結果、この断片中には5'末端側の開始コドンに加え、3'末端側に存在するはずのpoly(A)付加シグナルも認められなかった。そこで、5'RACE法及び3'RACE法を用いて、 S_8 -GP1のcDNAの全塩基配列を決定した(図1-3)。この塩基配列から S_8 -GP1は、N末端側に細胞外分泌シグナルを有する低分子量の塩基性蛋白質をコードしており、成熟蛋白質は分子内に8つのシステイン残基を有するものと予測された(図1-4)。これらの性状は、既知のPCP類と共通するものであったが、アミノ酸配列レベルでは、いずれのPCP類とも相同性が認められなかった。また、これまでに見出されたPCP類は、保存された8つのシステイン残基の位置を基準にPCP class-A(PCP-A1や、PCP1, 2, SLR1-BP1, 2)とPCP class-B(PCP-B)に分類されてきたが、 S_8 -GP1のシステイン残基の位置は、これまでに報告されているいずれのクラスとも一致せず、新しいクラスのPCP類であることが示唆された(図1-4)。

次に、 S_{12} ホモ系統株より S_{12} -GP1のクローニングを行った。 S_8 -GP1のcDNA配列から、5'末端側領域で2種類のprimer(GP1-F, GP1-5F)を設計し、poly(A)配列との間でnested PCRを行うことで、 S_{12} -GP1の部分cDNA断片の増幅に成功した。さらに、5'RACE法を用いて S_{12} -GP1の全cDNA塩基配列を決定した(図1-3)。 S_8 -GP1と S_{12} -GP1の塩基配列を比較すると、cDNA全体の相同性は67%であり、3'および5'末端側の非翻訳領域は比較的良く保存されているものの、推定される翻訳領域の相同性はかなり低いことが示された(図1-3)。翻訳領域についてアミノ酸レベルで比較すると、推定シグナルペプチド部分は92%と高度に保存されているものの、成熟蛋白質部分の相同性は28%と極めて低いものであった(図1-4)。すなわち、両成熟蛋白質が8つのシステイン残基を有する点は共通していたが、それ以外のアミノ酸残基は両者でほとんど

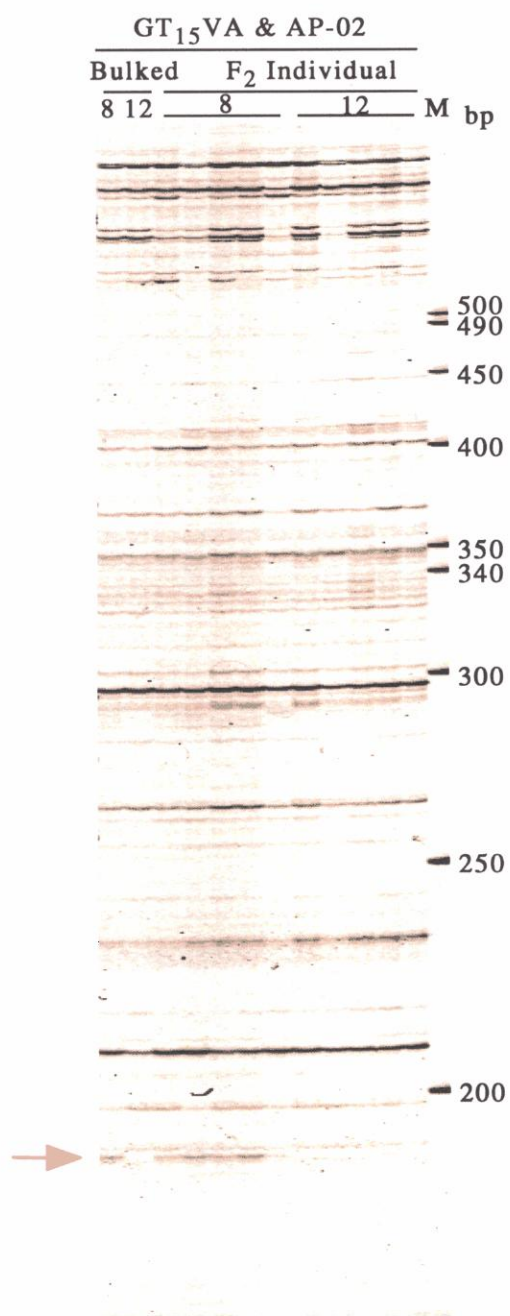


図 1 - 2 *GP1*の2段階目のFDDゲル電気泳動像

F₂分離個体中のS₈、S₁₂ホモ系統由来の葯より調製したcDNAをテンプレートに、蛍光標識したアンカーprimer (GT₁₅VA)と任意primer (AP02)を用いておこなった2段階目のFDD解析像。矢印は、S₈系統特異的な*GP1*由来のバンドを示した。

			+1		
<i>S</i> ₈	CTGCAAGTAAAAGAGAGAATCTTTTATCACTTTTCTGAATC ATG AAATCGGCTGTTTATG	19			

<i>S</i> ₁₂	CTGCAAGTAGAAGAGAAAATTTTCT--CACTTCTCTGAATT ATG AAATCTGCAATTTATG	19			
<i>S</i> ₈	CTTTATTATGTTTCATATTCATCGTTTCAGGCCATATTCAAGAACTGGAAGCTAATCTGA	79			

<i>S</i> ₁₂	CTTTATTATGTTTCATATTCATCATTTTAAGTCGTTCTCAAGAATT--AACAGAAGTTGG	77			
<i>S</i> ₈	---TG--AAG---CGGTGCACCCGTGGCTTTCGTAAGCTTGGAAAATGTACCACCTTAGA	131			
	*** ** *				
<i>S</i> ₁₂	AGCTGATAAGCAGCAGTGTAATAAAAAA--TTTC---CCT-GGGCATTGTGAGACTTCCGA	131			
<i>S</i> ₈	AGAAGAGAAATGC-AAAACATTATATCCGCGGGGTCAA-----TGCACA	173			
	*** * ** *				
<i>S</i> ₁₂	--AAG-G---TGCGAAAACA-CATACAAACGTC-TGAATAAGAAGGTTTTCGACTGCCAT	182			
<i>S</i> ₈	TGTTCAAGATAGTAAATGAATACTCATCTTGTGACTGTAAATCGTGT TAG CAAATGCTA	233			

<i>S</i> ₁₂	TGTCAACCTTTTGGTA-GAAGACGGCTT--TGTACATGTAAA---TG CTAA -----GCTA	233			
<i>S</i> ₈	TCTTATATATATTATTACTAGCTTTATTATCACAACTCTACTTTTTCTATTTCATTC	293			
	** ***** *				
<i>S</i> ₁₂	G-----TTTCTAGCTTTATTATGACAACAACTCTACTTTTCCGTTTCATTC	278			
<i>S</i> ₈	AAAAG-TCACTTACTAAAA ATAATT G-TTCGTTTAAAGT---CATTTTAAAT-TTAAAGT	347			

<i>S</i> ₁₂	AAAAGATGATTTTGTCAAA ATAATA GTTTCATTTTAA ATAAAA GTTTTCATGCAAAAGT	338			
<i>S</i> ₈	ATCAGTTGTTCTTTTTTTTATTATCCTTGT ATAAAA TC-AATTTTATTAAAT-AGAGTCA	405			
	*** ** *				
<i>S</i> ₁₂	ATCTGTTTTTTTTTTTGA-ATTATCCTTGTAACAAACGGATAATTATTTAATTATCTTT	397			
<i>S</i> ₈	TTACCAAAAAAAAAAAAAA 424				
	* * *				
<i>S</i> ₁₂	TGATCAAAAAAAAAAAAAA 416				

図 1 - 3 *S*₈-GP1、*S*₁₂-GP1 のcDNA塩基配列の比較

太字は開始コドン及び終止コドンを、矢じりはイントロン挿入位置、枠内は翻訳領域を示した。また はpoly(A)付加シグナルを示した。

Signal peptide

S ₈ -GP1	:	MK-SAVYALLCFIFIVSGHIQEL-E--ANLMKR----	CTRGFRKL-GKCTTILEEEKCKTLYP-R-----	GQCTCSDSKMNTTHSCDC-KSC	*	*	*	*	*
S ₁₂ -GP1	:	MK-SAIYALLCFIFILSRSELTEVGAD--KQ--QCKKNFP---	GHCEFS--ERCENTYK-RLNKKVFDCHCQ--	PFGRRLCTC-K-C					
S ₉ -SP11	:	MK-SAIYALLCFIFIVSSHVQE-VE--ANLRKT----	CVHRLNSG-GSCGKSGQHDCEAFYTNKTNQKAFYCNCT-	SPFRTRYCDCAIKCKVR					
PCP-A1	:	MKNTVKLSLIGFVMLTVLLGETVI--AQKRPK----	CYSQEPD-KT-CEVN---RCKANCVKHKHKKILLAFSTCKENNGNNMYCRCQYPCPP						
SLR1 BP	:	MKIYYRSSLIGLVMLTILLGV-V-ANAKGGPVRKQCEVEQYDPNGKCVID----	QCKAQCAKNRKGGLA--RCIDTGKGHMQCRCDYHC						

図 1 - 4 GP1 と SP11 及び PCP-A 間の推定アミノ酸配列の比較

GP1/SP11の推定アミノ酸配列及び、PCPのclass-Aに分類されるPCP-A1、SLR1-BPのアミノ酸配列を示した。予想シグナル配列領域と8つのシステイン残基の位置を枠で囲って示した。また、GP1/SP11間で保存されているアミノ酸残基を*で示した。(S₉-SP11 : Suzuki et al., 1999; PCP-A1: Doughty et al., 1998; SLR1-BP: Takayama et al., 2000b)

一致せず、またシステイン残基間のアミノ酸数も異なっていた。

続いて、 S_8 、 S_{12} 系統の若葉より調製した高分子量ゲノム DNA をテンプレートに、 S_8 、 S_{12} -*GPI* の cDNA 配列より作製した primer を用いて、PCR 法によるゲノム領域のクローニングを試みた。得られた PCR 増幅断片の塩基配列を決定した結果、 S_8 -*GPI* には約 4 kbp のイントロン領域が図 1-4 に示す位置に存在すること、また S_{12} -*GPI* も同じ位置にイントロンの挿入が認められるがそのサイズは 0.3 kbp であることが明らかになった。

以上の解析から、 S_8 および S_{12} 系統よりクローニングされた両 *GPI* が、対立遺伝子であるかどうかについては、さらに厳密な証明が必要であると思われた。

GPI のゲノムマッピング

S_8 および S_{12} 系統より得られた *GPI* が、*S* 遺伝子座に存在する対立遺伝子であることを直接的に証明するために、両 *GPI* のゲノム上の位置を特定することを試みた。まず、*GPI* と *SRK* との物理的距離をパルスフィールドゲル電気泳動を用いたサザンブロット法により解析した。すなわち、 S_8 および S_{12} 系統のゲノム DNA を rare-cutter 制限酵素の *Mlu*I で処理後、パルスフィールドゲル電気泳動により分離し、*GPI* 及び *SRK* の細胞外領域である *S*-domain をプローブとする DNA ゲルブロット解析に供した (図 1-5)。まず、 S_8 系統においては、両プローブによって同じ 80 kbp の位置にシグナルが検出されたことから、 SRK_8 および S_8 -*GPI* が 80 kbp の同一 DNA 断片上に存在することが示唆された (図 1-5)。同様に、 S_{12} 系統においては、 SRK_{12} と S_{12} -*GPI* が 135 kbp 以内に位置している可能性が示された (図 1-5)。

そこで、さらに詳細に *GPI* と *SLG* あるいは *SRK* とのゲノム上での位置関係や物理的距離を明らかにするために、LA (long and accurate) PCR 法を用いてこれら遺伝子間のゲノム領域を直接増幅することを試みた。なお、各遺伝子の位置関係や物理的距離に関しては、 S_8 系統において SLG_8 と SRK_8 とが逆向きの転写方向で約 15 kbp 以内に位置していることが示唆されていた (Boyes et al., 1997) が、他の情報は全くなかったので、全ての可能性を考慮に入れて複数のプライマーを設計して LA-PCR を行った。DNA の増幅が認められた場合には、それらをすべてクローニングして塩基配列を決定し、目的遺伝子を含む増幅断片であることを確認した。

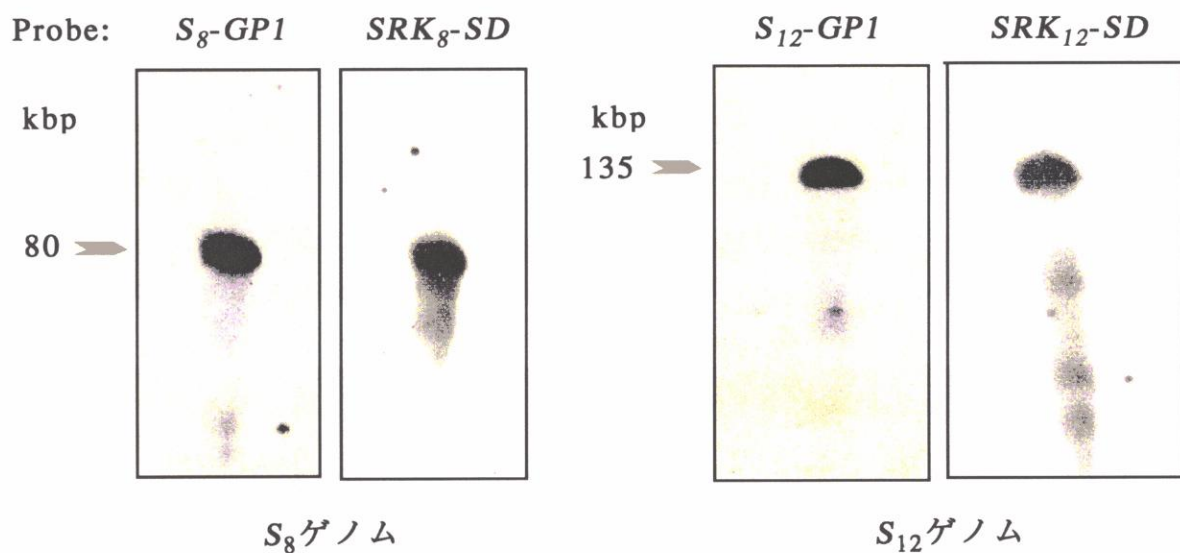


図 1 - 5 パルスフィールドゲル電気泳動を用いたDNAゲルプロット解析

B. rapa S_8 および S_{12} 系統由来のゲノムDNAを、制限酵素*Mlu*Iで処理してパルスフィールドゲル電気泳動を行い、DNAゲルプロット解析に供した。プローブには、各GP1の翻訳領域、SRKのS-domain (SD) 領域を用いた。

まず、 S_8 系統においては、図 1-6 に示す様に、 S_8 -*GPI* と SLG_8 の間、および S_8 -*GPI* と SRK_8 の間で DNA の増幅が認められ、 SRK_8 の上流約 5 kbp、 SLG_8 の上流約 4.5 kbp の位置にコードされていることが明かとなった (図 1-6)。また、 S_8 -*GPI* のイントロン配列は 4 kbp であることから、 SRK と SLG の間の距離は約 14 kbp であること、遺伝子の転写方向は S_8 -*GPI* と SRK が同方向、 SLG が逆向きでコードされていることを明らかにした (図 1-6)。

次に、 S_{12} -*GPI* の位置も、同様に LA-PCR 法によって解析を行ったところ、 S_{12} -*GPI* は SRK の上流約 10 kbp にコードされていることが明らかになった (図 1-9)。しかし、ゲノムをテンプレートとした LA-PCR 法では、 SLG 間の PCR 増幅断片が得られず、 SLG と S_{12} -*GPI*、もしくは SRK 遺伝子間には、LA-PCR 増幅範囲外である可能性が考えられた。そこで、当研究室によって作製された、 S_{12} 系統の BAC ライブラリー (剣持, 1999) を、 S_{12} -*GPI* をプローブに用いてスクリーニングした。約 7 万クロンの BAC ライブラリーをスクリーニングしたところ、 S_{12} -*GPI*、 SRK_{12} 、 SLG_{12} を全て含む、インサートサイズ 74 kbp の BAC クロロンが 1 つ得られた (梶原, 2001)。そこで、この BAC クロロンをテンプレートに SLG_{12} の 3' 末端付近と S_{12} -*GPI* の primer を用いて LA-PCR を行なったところ、 S_{12} -*GPI* の上流約 23.5 kbp の増幅断片が得られた (図 1-7)。この増幅断片と SLG_{12} 遺伝子の大きさ (1.5 kbp) を考慮に入れ、両遺伝子の距離は 22 kbp であることが明かとなった。これにより、 S_8 同様、 S_{12} -*GPI* も SLG と SRK 間にコードされていること、また S_{12} -*GPI* のイントロンが 0.3 kbp であることから、 SLG と SRK は互いに逆向きに約 34 kbp 離れてコードされていることが判明した。以上の解析より、 S_8 、 S_{12} 系統からクローニングされた *GPI* が互いに対立遺伝子であることが直接証明された。

筆者の S_8 および S_{12} 系統についての解析と並行して、共同研究者の日向らの研究グループは *B. rapa* の S_9 系統についてのゲノム解析を進め、 SRK_9 と SLG_9 が 76 kbp の *MluI* 断片上に存在することを示すと共に、このゲノム断片を P1 人工染色体 (P1-derived artificial chromosome) を用いてクローニングすることに成功した (Suzuki et al., 1997)。さらに、このゲノム断片をプローブにして葯 cDNA ライブラリーを検索し、12 個の葯発現遺伝子 [$SP1 \sim SP11$ (*S*-locus protein 1~11), $SAE1$ (*S*-locus anther expressed 1)] を見出すと共に、これらの内の $SP11$ と $SAE1$ の 2 つが葯特異的な発現を示すことを明らかにした (Suzuki et al., 1999; Watanabe

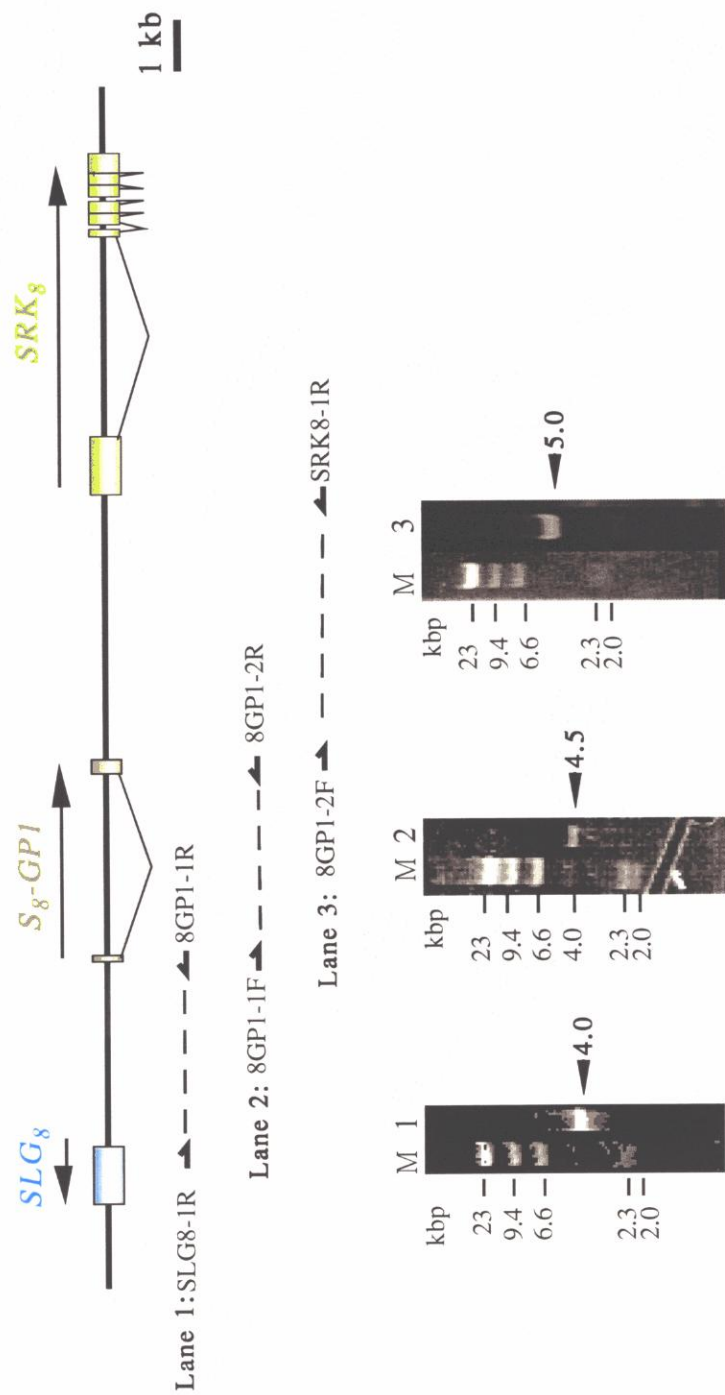


図 1 - 6 LA-PCR 法による S_8 遺伝子座の解析

S_8 系統のゲノム DNA を鋳型に、上記の primer により LA-PCR を行った結果 (電気泳動図) を示した。→, 遺伝子の転写方向、■, エキソン、M: λ HindIII digest マーカーを示した。図中 ▲ は primer の方向、その横には primer の名前を示した。

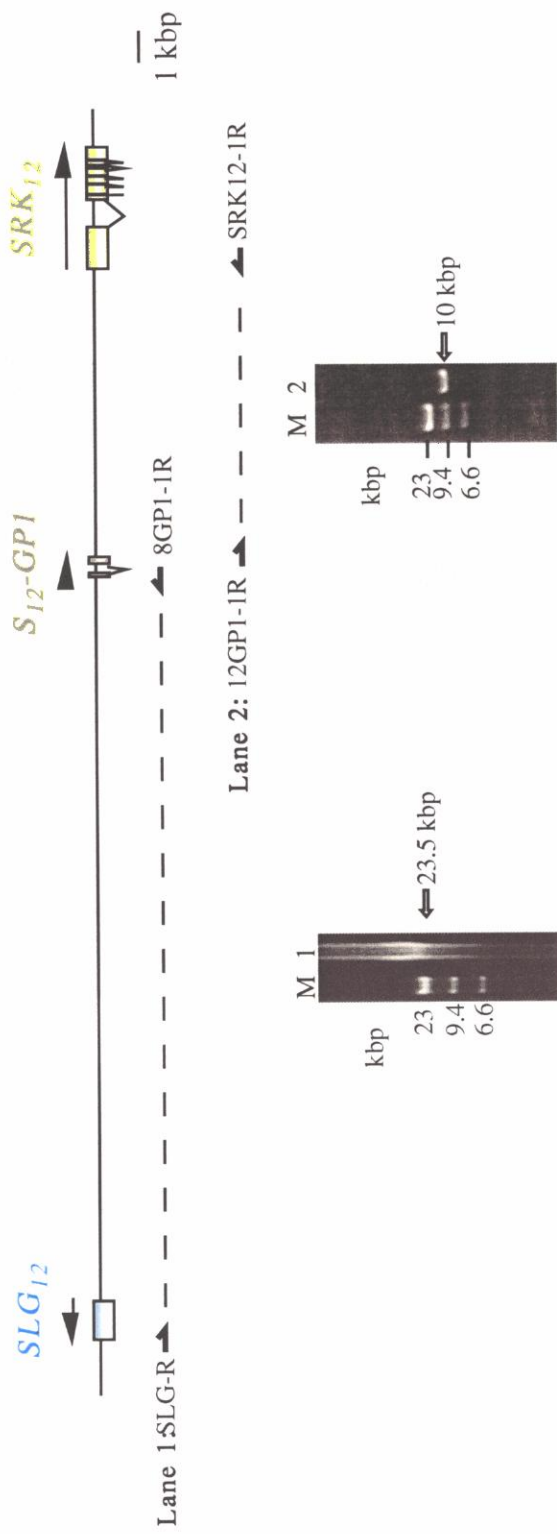


図 1-7 LA-PCR法による S_{12} 遺伝子座の解析

S_{12} 遺伝子座を含むゲノムのBACクローン (レーン1) 及び S_{12} 系統のゲノムDNAを鋳型に、上記のprimerを用いて遺伝子間をLA-PCR法により増幅した結果を示した。→, 遺伝子の転写方向、I, エキソン、M, λ HindIII digest マーカーを示した。図中 $\blacktriangle$ はprimerの方向、その横にはprimerの名前を示した。

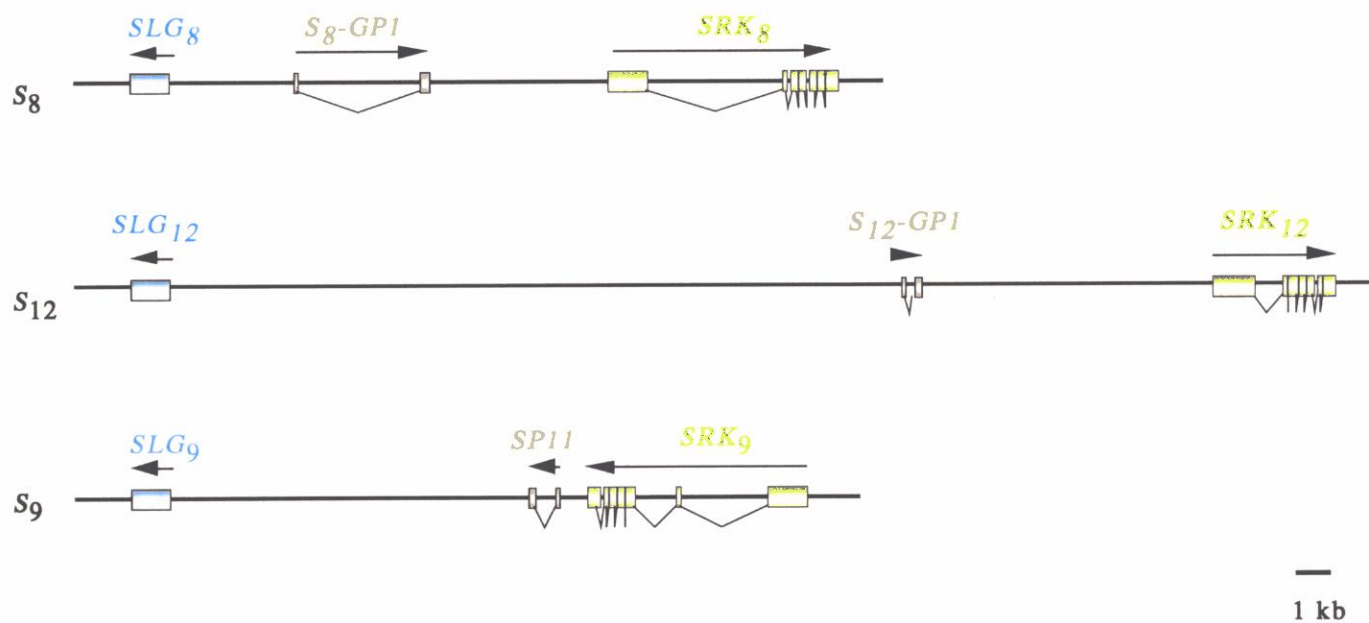


図 1 - 8 S遺伝子座の構造比較

矢印は遺伝子の転写方向を、□ はエクソン部分を示した。*S9*-S遺伝子座のデータは Suzuki et al., 1999より引用。

et al., 1999)。この内の *SP11* は、筆者らが見出した *GPI* と相同な PCP 類をコードしていること (図 1-4)、ゲノム上 *SLG*₉ と *SRK*₉ の間に位置する遺伝子であったことから (Suzuki et al., 1999)、*GPI* と対立遺伝子の関係にあることが判明した (図 1-8)。これより *GPI* を *SP11* と表記する。尚、*S* 遺伝子の由来を明確にするために *S*₈ 系統の *SP11* は、*S*₈-*SP11* の様に示す。

***SP11* の発現解析**

これまでに見出されてきた class-A に属する PCP 類 (*PCP1*, 2; *PCP-A1*; *SLRI-BP1*, 2) の発現は、何れも配偶体 (n) である花粉においてのみ認められることが示唆されてきた (Stanchev et al., 1996; Doughty et al., 1998; Takayama et al., 2000a)。また、class-B に属する PCP 類においても、その発現時期から、配偶体である花粉でのみ発現していることが示唆されている (Doughty et al., 2000)。しかし、アブラナ科植物の自家不和合性における花粉の表現型は、花粉親が持つ 2 つの *S* 遺伝子の影響を受けることから、花粉側 *S* 因子である *SP11* は孢子体 (2n) 組織 (花粉以外の葯組織あるいは減数分裂以前の花粉母細胞) で生産されていることが期待された。この点を検証するために、*SP11* の発現部位・時期について詳細な検討を行った。

まず、RNA ゲルブロット法により、*S*₈-*SP11* の発現部位・時期を器官単位で解析した (図 1-9)。なお、花粉特異的発現が示されている (*B. oleracea* 由来の) *PCP-A1* の *B. rapa* におけるオーソログと推定される *BrPCP-A1* を、発現解析の比較対照として用いた (Takayama et al., 2000a)。

その結果 *S*₈-*SP11* は、柱頭や葉では発現が認められず、開花 1~5 日前に相当する stage 4~7 の葯で特異的に発現していることが示された。一方、*BrPCP-A1* は、開花 1~3 日前 (stage 5~7)、特に開花直前 (stage 7) の葯で強く発現していることが示された。すなわち、いずれも葯特異的に発現するものの、*S*₈-*SP11* は *BrPCP-A1* に比べて早い時期に発現が始まることが示された。

次に、RNA ゲルブロット法により発現が認められた時期の葯について、*S*₈-*SP11* と *BrPCP-A1* の発現部位を明確にするために、*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析を行った (図 1-10)。図には、stage 5 (開花 3 日前) と stage 7 (開花 1 日前) を示した。Stage 5 は花粉が 2 から 3 核期にあたり、花粉を包んでいる花粉嚢の内側をタペート組織が裏打ちしている時期、stage 7 は花粉が 3 核期にありタペート組織が崩壊・消失した後の時期に相当する (船戸, 2001)。

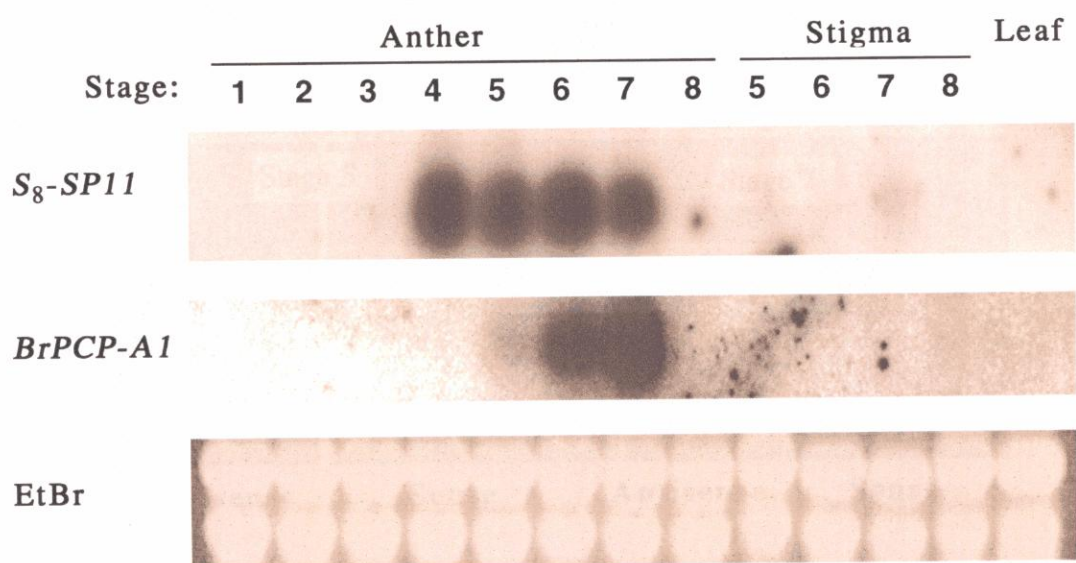


図 1 - 9 *S₈-SP11*のRNAゲルプロット解析

各ステージは、蕾の長さを基準に分類した（1 = 0-1 mm, 2 = 1-2 mm, 3 = 2-3 mm, 4 = 3-4 mm, 5 = 4-5 mm, 6 = 5-7 mm, 7 = 7-10 mm）。また、ステージ8 は開花当日の花を示す。

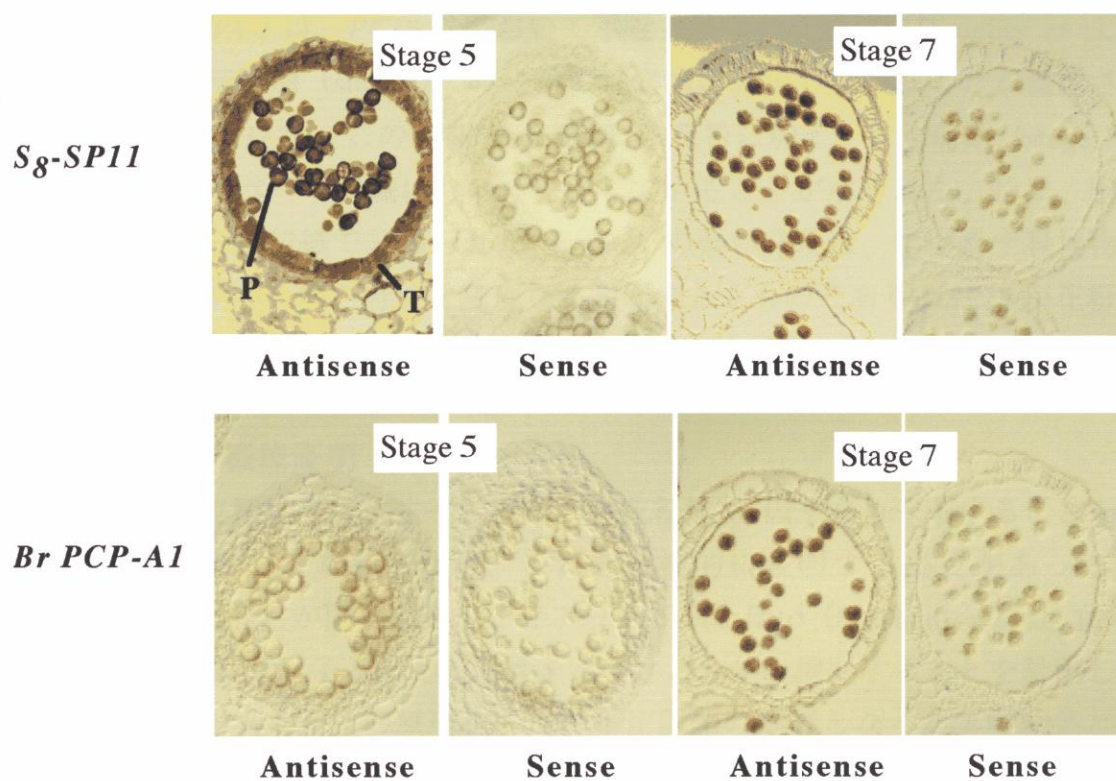


図 1 - 1 0 葯組織における *Sg-SP11* の *in situ* ハイブリダイゼーション解析

Sg-SP11 及び *Br PCP-A1* の翻訳領域の antisense もしくは sense RNA probe を用いた。ステージは図 1 - 9 参照。P, 花粉、T, タペート組織。

BrPCPA-1 は、*PCPA-1* において示唆されていた様に (Doughty et al., 1998)、発達段階後期 (stage 7) の花粉で特異的に発現していることが確認された。一方、*S₈-SP11* は、この時期 (stage 7) の花粉に加え、より前期 (stage 5) の花粉と葯のタペート組織において発現していることが示された。特に、孢子体であるタペート組織で認められた *S₈-SP11* の強い発現は、アブラナ科植物の孢子体型自家不和合性の特性を無理なく説明できるものであり、*SP11* が花粉側 *S* 因子である可能性をさらに強く支持するものであった。

SP11 の機能証明

上記実験結果は、すべて *SP11* が花粉側 *S* 因子をコードすることを間接的に支持するものであったが、これを直接的に証明する必要があった。そこで Stephenson らが開発したバイオアッセイ系を用い (Stephenson et al., 1997)、*SP11* が花粉側 *S* 因子としての活性を示すかどうかを検討することを計画した。このバイオアッセイ法の原理を、この手法開発の基礎となった実験結果と共に図 1-11 に示した。Stephenson らは、まず乳頭細胞を他個体の花粉表層物質 (pollen coat) で処理した後に他家受粉しても和合性のままだが、自己の花粉表層物質で処理すると不和合性に変化し、他個体の花粉 (和合花粉) の吸水が特異的に阻害されることを示した。次いで、他個体の花粉表層物質に自己の PCP 蛋白質画分を添加したもので乳頭細胞を処理しても不和合性に変化することを示し、PCP 類中に花粉側 *S* 因子が含まれることを明らかにした。筆者は、この PCP 蛋白質画分の代わりに、大腸菌を用いて発現させた *S₉-SP-11* を添加することで、花粉側 *S* 因子としての生物活性を測定した。

バイオアッセイ結果を図 1-12 にまとめて示した。まず、用いた *S₉* 系統の乳頭細胞は、同じ *S₉* 系統の花粉に対し強力な不和合性反応を示し、吸水した花粉は 2% であったが、異なる *S₈* 系統の花粉に対しては和合性を示し、72% の花粉が吸水した。次いで、*S₉* 系統の乳頭細胞を *S₈* 系統の花粉表層物質で処理してから *S₈* 系統の花粉を受粉しても、花粉の吸水率は 71% とほとんど変化しなかったが、*S₉-SP11* 発現蛋白質を *S₈* 系統の花粉表層物質に添加したもので処理すると、花粉の吸水率は 11% まで低下した。なお、この *S₉-SP11* 発現蛋白質の花粉吸水に及ぼす阻害効果は、*S₉* 系統の乳頭細胞を処理した場合に特異的に認められ、異なる *S₈* 系統の乳頭細胞に処理した場合には花粉の吸水率は変化しなかつ

た。この結果は、 S_9 -SP11 が S_9 系統の乳頭細胞に対して特異的に不和合性反応を誘起する花粉側 S 因子であることを直接的に証明するものであった。

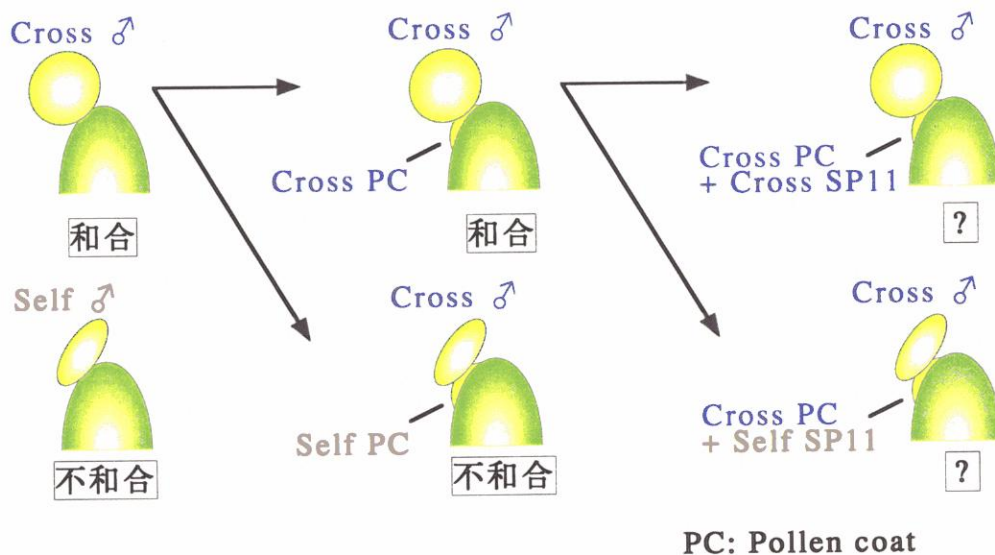


図 1 - 1 1 花粉の吸水反応を指標としたバイオアッセイ法

乳頭細胞に非自己の花粉 (cross) を受粉させると花粉は吸水するが、自己の花粉 (self) の場合は吸水が阻害される (図左)。Stephensonらは、乳頭細胞を非自己の花粉表層物質 (cross PC) で処理した後に非自己の花粉を受粉 (cross) しても和合性のままだが、自己の花粉表層物質 (self PC) で処理すると不和合性に変化し、非自己の花粉 (cross) の吸水が特異的に阻害されることを見出し、花粉表層物質中に花粉側S因子が存在していることを示した (図中央) (Stephenson et al., 1997)。そこで、乳頭細胞に非自己の花粉表層物質 (cross PC) にS₉-SP11を混合したものを処理した後に、非自己の花粉を受粉することで、SP11の花粉側S因子としての生物活性を解析した (図右)。

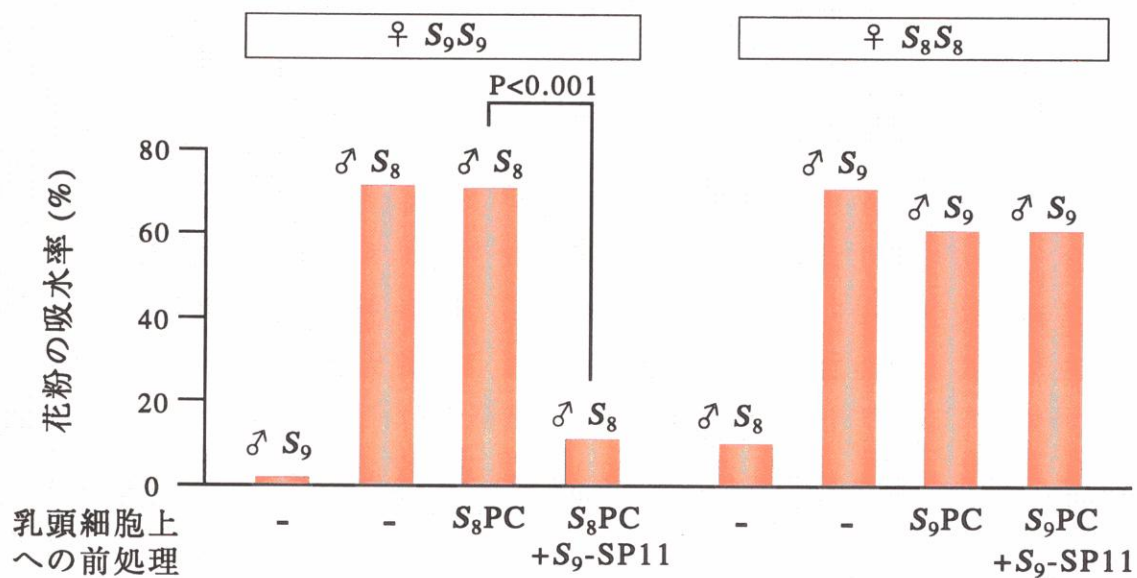


図 1 - 1 2 花粉の吸水反応に対する S₉-SP11 の阻害効果

S₉系統の柱頭に予め大腸菌発現S₉-SP11を処理すると和合花粉 (S₈系統) の吸水が有意に (P < 0.001) 阻害された。このS₉-SP11の効果はS8系統に対しては認められなかった。PC, 花粉表層物質。

1 - 4 考察

本章では、まず FDD 法を用いた検索により *B. rapa* S_8 あるいは S_{12} 系統に特異的な葯発現遺伝子を 9 個見出し、そのうちの一つ *GPI* が *SLG* と相互作用する PCPA-1 と性状の類似した新規 PCP 類をコードしていることを明らかにした。*GPI* は、FDD 法により S_8 系統特異的遺伝子として見出されたが (S_8 -*GPI*)、PCR 法を用い S_{12} 系統からも相同な遺伝子 (S_{12} -*GPI*) をクローニングすることに成功した。 S_8 -*GPI*, S_{12} -*GPI* 間の相同性は極めて低いものであったが、詳細なゲノムマッピングにより、これらが *SLG* と *SRK* の間に位置する *S* 遺伝子座上の対立遺伝子であることを明らかにした。更に、 S_9 系統の *SLG/SRK* ゲノム領域に見出された葯発現遺伝子 S_9 -*SP11* とも複対立遺伝子の関係にあることが示され、*GPI/SP11* が *S* 遺伝子座上に普遍的に存在する花粉側因子であることが示唆された (以降 *GPI* を *SP11* と称する)。次いで、RNA ゲルブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた発現解析を行い、*SP11* が花粉 (n) と葯のタペート組織 (2n) の両方で発現していることを明らかにした。さらに、大腸菌に発現させた S_9 -*SP11* が、 S_9 系統の乳頭細胞に対し特異的に不和合性反応を誘起して (和合) 花粉の吸水を阻害することを示し、*SP11* が花粉側 *S* 因子としての機能を有することを直接的に証明した。

今回、FDD によって見出された 9 つの遺伝子は、何れも葯や花粉において発現し、*S* 遺伝子間で多型を示す遺伝子であり花粉側 *S* 因子の有力な候補遺伝子であった。筆者は、これらの遺伝子のうち、*SP11* (*GPI*) と *GP2* が広義の PCP 類をコードしていると判断して詳細な解析を行った (下里, 1999)。本研究により高度な多型性を示すことが判明した *SP11* (*GPI*) に対し、*GP2* の配列は *S* 系統間で高度に保存されていることが判明し、花粉側 *S* 因子をコードしている可能性は低いと判断された (下里, 1999)。しかし、PCR-RFLP 法を用いた連鎖解析の結果、100 以上もの F_2 分離個体において *S* 遺伝子座との組み換えが認められず、この *GP2* も 0.5 cM 以内の遺伝的距離に位置している遺伝子であることが示された。FDD 解析で見出された残りの 7 つの遺伝子については詳細な解析は行わなかったが、多くのものが、*A. thaliana* の第一染色体上にコードされる遺伝子と相同性を示す点が注目された (表 1—1)。この結果は、Conner らが *B. rapa* の *S* 遺伝子座近傍の遺伝子マーカーが、*A. thaliana* の第一染色体上の *ETRI*

(ethylene response gene) 近傍の遺伝子に対応していることを見出した結果と一致するものであった (Conner et al., 1998)。実際、筆者が見出した GP8 相同遺伝子は、*ETRI* と同じ BAC クローン (T27F4) 上にコードされていた。また、このクローンと隣接する BAC クローン (F4N21) 上に、先述の GP2 に対応する遺伝子がコードされていることが判明した。この様に FDD 解析において見出された 9 つの遺伝子の内、目的遺伝子であった *SP11* (*GPI*) を含め幾つかの遺伝子は、目的とする遺伝子座のかなり近傍にコードされる多型性遺伝子であることが示唆された。FDD 法は一般に発現変化を示す遺伝子の同定に用いられる方法であるが、本研究で用いた様に、系統間で多型を示す遺伝子の同定やその近傍にコードされるマーカー遺伝子の同定にも有効であると思われる。

さて、筆者は *SP11* が花粉側 *S* 因子をコードすることを発現 *SP11* の生物活性を測定することで蛋白質側から直接的に証明したが (Takayama et al., 2000a)、当研究室では、形質転換の手法を用いた遺伝子側からの証明も成された。すなわち、*S₈-SP11* および *S₉-SP11* を *B. rapa* cv. *Osome* (*S₅₂S₆₀* 系統) に個別に導入した形質転換体が作出され、両形質転換体の花粉が新たな *S* 表現型を獲得し、それぞれ *S₈* および *S₉* 系統の柱頭に対して不和合となることが示された (中川, 2000; Shiba et al., 2001)。

諸外国でも花粉側 *S* 因子の探索が成されてきたが、Schopfer らは、*B. rapa* *S₈* ホモ系統の *SLG/SRK* ゲノム領域の解析を進める過程でシステイン残基に富む蛋白質をコードする遺伝子を見出し、*SCR* (*S*-locus cysteine rich) という独自の名前で報告した (Schopfer et al., 1999)。なお、この論文の中では、*S₉-SP11* は "related gene" として引用されているが、*SP11* と *SCR* は複対立遺伝子の関係にあり、彼らが見出した *SCR₈* と筆者が見出した *S₈-SP11* は同一の遺伝子である (Takayama et al., 2000a)。彼らは γ 線照射により得られた *B. oleracea* *S₁₃* 系統の自家和合性変異株の一つが *SCR₁₃* を欠失していたという loss of function の実験結果、及び *B. oleracea* *S₆* 系統由来の *SCR₆* を *B. oleracea* *S₂* 系統に導入した形質転換体の花粉が *S₆* 系統の柱頭に対して不和合性を示したという gain of function の実験結果から、*SCR* が花粉側 *S* 因子をコードしていることを証明した。

筆者は、*S₈-*, *S₉-*, *S₁₂-SP11* の cDNA 塩基配列の比較から、シグナルペプチドコード領域の塩基配列が極めてよく保存されていることを明らかにした。その後、

この領域の塩基配列をプライマーとして用いた RT-PCR 法により、新たに 15 もの class-I の *S* 系統から *SP11* 遺伝子がクローニングされ、この領域が class-I の *S* 系統で広く保存されていることが確認された (Watanabe et al., 2000)。これまでに見出された *SP11* の幾つかを図 1-13A に比較して示したが、このシグナル配列部分と 8 つのシステイン残基、さらに図中*で示したグリシン残基及び#で示した芳香族アミノ酸残基が比較的良く保存されている以外は、相互にほとんど相同性を示さなかった。また、最近当研究室において、class-II 系統からも *SP11* がクローニングされ、*SLG* および *SRK* の場合と同様、class-I とは、異なるグループを形成することが示された (図 1-13B)。Class-II 系統内の *SP11* の配列は class-I のものよりも比較的良く保存されており、このことは class-II に属する *S* 遺伝子類が進化の過程で比較的最近になって分岐してきたことを示唆しているのかもしれない。また、花粉側 *S* 因子と柱頭側 *S* 因子という互いに相互作用する必要がある蛋白質の対 (組み合わせ) が、進化の過程でどの様にしてこれだけ多数生み出されてきたのか大変興味深い。

花粉側 *S* 因子と柱頭側 *S* 因子の間で組み換えが生じると、自家不和合性が打破されることが期待されるが、そうした和合性変異株の例はこれまで全く見出されておらず、*S* 遺伝子座には何らかの組み換えが抑制機構が存在すると考えられてきた。今回、花粉側 *S* 因子 *SP11* が、柱頭側 *S* 因子 *SRK* のごく近傍にコードされていることが判明し、この物理的距離の短さが、組み換えが生じない一つの要因であると推察された。また、*S* 遺伝子座を構成する *SRK*、*SP11*、*SLG* の 3 つの *S* 遺伝子は、*S* 遺伝子間で高度な多型性を示す上に、イントロンの大きさや転写方向も多様であることが明らかになった。さらに、3 つの *S* 遺伝子間の距離も相互に大きく異なり、また各遺伝子を結ぶ領域の塩基配列にも *S* 遺伝子間で全く相同性が認められないことが判明した (梶原, 2001)。今回の研究で明らかとなったこれら *S* 遺伝子座ゲノム領域の構造的特性は、減数分裂時にこの領域が異なる *S* 遺伝子間では対合しない可能性を強く示唆しており、この特性こそが組み換えを抑制している最大の要因であると考えられた。

これまでに解析された *PCP* 類 (class-A 及び class-B) は、すべて花粉においてのみ発現が認められたのに対し (Stanchev et al., 1996; Doughty et al., 1998; Doughty et al., 2000; Takayama et al., 2000b)、*SP11* は花粉に加え、葯のタペート

	Signal peptide	*	#			
S ₈	MKSAIYALLCFIFIV-SGHIQELEANLMKR	CTRGFRKLGRCTTLEEEK	CKTLYP-RG-Q----	CTCSDSKMNTHS	CDCKS----	C
S ₉	MKSAIYALLCFIFIV-SSHVQEVEANLRKT	CVHRLNSGGSCGKSGQHD	CEAFYTNKTNQK-AFYNCITSPFRTYR	----	CDCAIK--	CKVR
S ₁₂	MKSAIYALLCFIFIILSRSQELTEVGADKQC	---KKNFPGHCETS---	ERCENTYKRLNK-KV-FDCHQC	PFGRRL	CTCK----	C
S ₂₁	IFIIISSHFQ-VEAKP----	CADTF--PGLCRNGGNER	CAISFSSYKRRK-ASNCQ	CRPYDDKKRL	CDCE----	C
S ₃₂	IFVV-SIHVQGVEANPTKL	CRGSVTSRGVCDNSGVQR	CVTEFS-KKIDKDPRL	CSCTCRHHEGRRF	CPCE----	CKC
S ₃₄	LFII-SSHSQEVEANKVK	CFRRRTLGTGCVSPGGDKR	CEDYFKNKLNEKTAFNC	NCVGSR-KHAL	CTCEIRRN	CFPY
S ₃₆	LFVV-SSHVQGVEANLTKL	CPGNVTSRGVCGNSGVQS	CVTAIS-KKLHKDRRL	CSCLCKIHEGHRF	CPDV----	CKC
S ₄₁	IFIV-SSHGQLEAHLMKN	CKADRLRPGCGNSRIS--	CEPLYHDNCRRMPSK	CKCSNESD-GGR	CVCLYLI	
S ₄₆	IFIV-SGHIQEVEANPMK	CKKIGYRMPGNCALAQT--	CENFC	CSRGEKKPSH-WKCTNGPKNTYS	CDCK	
S ₄₈	IFII-SSHFQEVEANVMKL	CYRKRTFDVFCVKPENKH	CEDLFKKDLKEITAYNC	CTCVKLYSKSG--	CTCKLGRK	CDPRHFF
S ₅₂	MKSVIYALLCFIFIV-SSHAQDVEANLMNR	CTRELFPFGKCGSSEDGG	CKILYSSEKKLHPSR	CECEPRYKA--	RFCCKKI----	C

B

Signal peptide

*S*₂₉ MRYATSIFFFLTKEIHYLCFIFLTLTSVQALDVGARNCEPEGIAKSNDVIGTGLNLTCSRDKKHFF---GPNVTNMLDLYPFSTHNRVRITCYCCVKVS

*S*₄₀ MRYATYIYFFLTKEIHYLCFIFLTLTYVQALDVGAWKCPGAVAKADNITGTGVNSVSEDCOR-F-V-GPNVNNCLDLKFSEHNRRGRITCYCCVKVS

*S*₆₀ MRYATSIIYFTLNIHYLCFIFLILTYVQALDVGAWKCEPGIVYSPISGRGINSRSTECKKHVEYEGQNVNTNRCRDYTSMPNPARITCYCCVKVS

図 1-13 SP11のアミノ酸配列の比較

(A) : *B. rapa* class-I系統由来のSP11の推定アミノ酸配列。S₂₁-, S₃₂-, S₃₄-, S₃₆-, S₄₁-, S₄₆-, S₄₈-SP11のN末端領域のシグナル配列は未定である。成熟蛋白質内で保存されているシステイン残基を枠で囲って示した。また、S遺伝子間で比較的保存されているグリシン残基は*で、芳香族アミノ酸残基は#で示した。

(Watanabe et al., 2000より引用)

(B): *B. rapa* class-II系統由来のSP11のアミノ酸配列。(S₂₉-, S₄₀-, S₆₀-SP11, Shiba et al., 2002)

組織でも発現していることが明らかとなった。Doughty らは、花粉側 *S* 因子が PCP-A1 様の発現を示すことを想定して、花粉が孢子体型の *S* 表現型を示すことを「シャッフリング仮説」で説明しようとした (Doughty et al., 2000)。これは、花粉において生産された花粉側 *S* 因子が、一旦花粉嚢内に放出され、そこで相互に混ざり合った後に花粉表層に付着することで、花粉が孢子体型の *S* 表現型を示すとするモデルである。しかし、*SP11* の発現が認められたタペート組織は、孢子体である上に、従来から花粉表層に様々な蛋白質を分泌していることが示唆されてきた組織である (Piffanelli et al., 1998)。*SP11* 蛋白質も、同様にこの組織で作られた後に、分泌あるいは本組織の崩壊に伴う放出により花粉表層に付着すると考えれば、アブラナ科植物の孢子体型の自家不和合性を無理なく説明できよう。

本章では、Stephenson らが開発した花粉の吸水反応を指標とするバイオアッセイ系を用いることで、*SP11* が花粉側 *S* 因子であることを直接的に証明した。しかし、使用した *SP11* 発現蛋白質とバイオアッセイ系には幾つかの問題点があった。まず、用いた *SP11* は、非特異的吸着を抑えるために一度還元条件下で精製したものを、最終的には非還元条件下において回収したので、様々な酸化状態の *SP11* の混合物であったと考えられる。従って、正しいコンフォメーションを持ち、花粉側 *S* 因子としての生物活性を示した *SP11* は、使用した *SP11* の一部であったに過ぎないと推定される。また、用いたバイオアッセイ系は、*SP11* を高い粘性を有する pollen coat に混ぜた後、マニピュレーターを用いて乳頭細胞に塗布するというものであったため、操作が非常に難しく、定量的な解析も困難であった。次の第 2 章では、これらの問題点を解決しつつ、*SP11* の一次構造の解明を目指した。

第 2 章

花粉側 S 因子 SP11 の一次構造の決定

2 - 1 序

第1章では、FDD 解析および *SLG/SRK* ゲノム領域の解析により見出されてきた *SP11* が、自家不和合性における花粉側 *S* 因子をコードしていることを明らかにしてきた。しかし、*SP11* の自他識別反応における役割や *SRK* あるいは *SLG* との機能上の関係等についてさらに追求して行くには、花粉上の *SP11* の一次構造を解明すると共に、正しいジスルフィド (S-S) 結合を持つ *SP11* を作製し、それを用いて生化学的な解析を進めていくことが不可欠である。

筆者は、すでに *SP11* が花粉と葯のタペート組織で発現していることを遺伝子レベルで明らかにし、これら組織で作られた *SP11* が花粉表層に移行して花粉側 *S* 因子として機能していることを推察してきた。しかし、花粉表層における蛋白質レベルでの *SP11* の存在はいまだ確認出来ておらず、*SP11* の蛋白質構造に関する情報も全く得られていない。また、筆者は花粉の吸水を指標とするバイオアッセイ系を用いて、*S₉-SP11* 発現蛋白質が花粉側 *S* 因子として機能し、*S₉* 系統の乳頭細胞に特異的に不和合性反応を誘起することを示してきた。しかし、この実験に用いた *S₉-SP11* は様々な S-S 結合を持った分子種の混合物であり、どの様な S-S 結合を持つ *S₉-SP11* が花粉側 *S* 因子としての活性を示したのかについては不明であった。

そこで、第2章においては、花粉表層中の *SP11* を蛋白質レベルで検出し、それを精製単離して蛋白質構造に関する知見を得ること、さらに以降の生化学的実験を遂行するに十分な量の活性型の *SP11* 蛋白質を人工的に調製することを目的とした。

2 - 2 材料及び方法

SP11 蛋白質の免疫組織化学的解析

SP11 特異抗体の作製

抗原蛋白質は1章記載の GST-S₉-SP11 と同様に、大腸菌発現系により作製した S₈-SP11 の GST 融合蛋白質をウサギに接種し、GST-S₈-SP11 に対するポリクローナル抗体を作製した。発現ベクターの構築は以下の通り行い、蛋白質の発現と精製は1章:SP11 発現蛋白質の作製(p. 26)と同様に行った。S₈-SP11 の cDNA 断片より、シグナル配列と予想された配列を除いた 20 残基目のグルタミン残基以降のコーディング領域を制限酵素サイト *Eco*RI と *Xho*I (TaKaRa) を付加するよう設計した primer

S₈-SP11: forward 5'-GGAATTCCCAAGAACTGGAAGCTAATCTGA-3',
reverse 5'-GCTCGAGTCTAACACGATTACAGTCACAG-3') を用いて、PCR 増幅を行い発現ベクターである pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia) の *Eco*RI と *Xho*I サイトに導入した。

抗原として使用した蛋白質は、GST 融合蛋白質であるため S₈-SP11 特異抗体を得るために、GST-S₉-SP11 固定カラムに一度供することで非特異的な抗体を除去し、続いて GST-S₈-SP11 固定カラムによるアフィニティー精製を行った。GST-SP11 蛋白質の固定カラムは、融合蛋白質を NHS-activated Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia) を用いて作製した。まず、得られた抗血清 10 ml から硫酸沈殿法によって IgG 画分 (鈴木, 1994) を精製し、PBS で平衡化した PD-10 カラム (Amersham Pharmacia) により脱塩を行った後に GST 融合 S₉-SP11 を固定したカラムに供した。このカラムに対する非吸着画分を S₈-SP11 固定カラムに供し、0.1 M Glycine-HCl (pH 1.8) 10 ml により溶出させた。なお、溶出画分は 0.5 ml 毎分取し、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 9.5) により中和した。次に Protein assay kit (BIO-RAD) により蛋白質定量を行い、最も蛋白質が溶出した画分 2.5 ml を PBS で平衡化した PD-10 カラムに供したものを S₈-SP11 特異抗体として使用した。

免疫光顕

B. rapa S₈ 系統の葯 (stage 5, stage 7) のパラフィン切片 (10 μ m) (1章: *in situ* ハイブリダイゼーション解析、p. 25 参照。) を 1% (w/v) non-fat dry milk (NFM),

1% (v/v) goat anti serum in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl) 中、37℃で 30 分間ブロッキングした。次に、上記ブロッキング溶液で 100 倍希釈した抗 S_8 -SP11 特異抗体中で 37℃で 1 時間反応させた。次に、0.05% Tween 20 in TBS buffer (TBST) で洗浄した後、二次抗体として TBST buffer で 100 倍希釈した alkaline phosphatase 標識の goat anti-rabbit IgG (Biocell Research Laboratories) 抗体溶液中で、37℃で 1 時間反応させた。その後、TBST で洗浄し、BCIP/NBT 発色キット (Sigma) を用いて発色させた。なお、コントロールとして S_9 系統の葯組織を同様に処理し、発色の特異性を確認した。

免疫電顕

B. rapa S_8 系統の葯組織を、4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde を含む sodium cacodylate buffer (pH 7.4) で固定し、LR White (London Resin Co., London) 樹脂に包埋して 80 μ m の切片を作製して使用した。これを、NFM-PBS buffer で 100 倍希釈 (v/v) した抗 S_8 -SP11 抗体溶液中、4℃で一晩反応させた。次に、PBS で 100 倍希釈した金コロイド (20 nm) 標識 goat anti-rabbit IgG 溶液中で 25℃、1 時間反応させた。その後、標識された切片を uranyl acetate で染色し、日立透過型電子顕微鏡 (H-7100, 日立) によって観察した。

花粉抽出物からの SP11 蛋白質の精製

花粉表層蛋白質の抽出

-80℃にて保存しておいた S_8 、 S_9 ホモ系統の葯 (5,000 花分) を 1 M 酢酸 (8 ml $\times$ 3) 中で激しく攪拌することにより、花粉表層物質を抽出した。脱脂綿を詰めたガラス管を通して葯・花粉を除去した抽出液を 1 M 酢酸で予め平衡化した SP Sephadex C-25 (Amersham Pharmacia) カラム (V = 5 ml) に付し、1 M 酢酸 25 ml、2 M ピリジン 25 ml で洗浄後、2 M ピリジン-酢酸 (pH 5.0) 25 ml により強塩基性ペプチド画分を回収し (寒川, 1991)、凍結乾燥した。

免疫沈降法による SP11 蛋白質の精製

免疫沈降には、 S_8 -SP11 抗体 200 μ g を、予め rProteinA Sepharose (Amersham Pharmacia) 100 μ l に結合させた後、抗体と rProtein A の間を dimethylpimelimide (東京化学) を用いて化学的に架橋したものを使用した (浜口, 1998)。5,000 個分の葯より調製した強塩基性ペプチド画分 (2 M ピリジン-酢酸溶出画分) を

0.05% Tween20 を含む TBS buffer (TTBS) 1 ml に溶解し、上記の抗体固定化樹脂 20 μ l を添加し、4℃で 2 時間吸着させた。樹脂を遠心分離により回収し、TTBS buffer で洗浄した。抗体固定樹脂に吸着した免疫沈降物質は、0.1 M glycine-HCl (pH 1.8) 100 μ l で溶出後、直ちに 1 M Tris-HCl (pH 9.5) により中和を行い、Zip-Tip (Millipore) を用いて脱塩後 MALDI-TOF-MS による分子量解析に供するか、SDS サンプル buffer で溶出後、16% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた PEPTIDE-PAGE 電気泳動 (TEFCO) に供した。泳動後のゲルは、silver stain II Kit (Wako) を用いた銀染色に付すか、下記のウエスタンブロット解析に供した。

ウエスタンブロット解析

泳動後のゲルを、ウエット式ブロティング装置 (TEFCO) により blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) を用いて、180 mA 定電流で 1 時間、0.22 μ m PVDF メンブレン (TEFCO) に蛋白質を転写した。

転写後のメンブレンを 5% スキムミルクを含む TTBS で、室温で 1 時間ブロッキングした。メンブレンを TTBS で軽くすすいだ後、精製した S_8 -SP11 抗体を抗体希釈溶液 1% gelatin (BIO-RAD) を含む TTBS で約 10 ng/ml に希釈した溶液に浸し、室温で 1 時間反応させた。次に、メンブレンを TTBS で 6 回洗浄し、抗体希釈溶液により 5,000 倍希釈した標識二次抗体 anti-rabbit IgG HRPconjugate (BIO-RAD) 溶液中で室温、1 時間反応させた。シグナルの検出は、ECL plus (Amersham Pharmacia) を用いて行い、x-ray film (Amersham Pharmacia) に感光後、自動現像機 (Fuji) により現像した。

酸化型 SP11 蛋白質の作製

S_8 -SP11 蛋白質の化学合成

S_8 -SP11 については、N 末端から 25 残基目のアスパラギン残基以降の成熟蛋白質部分を PEPTIDE 研究所 (大阪) に依頼して全化学合成した。すなわち、全体を図 2-1 に示す 7 つのブロックに分けてそれぞれを固相合成あるいは液相合成し、それらを順に縮合させた後、脱保護することで調製した。得られた脱保護 S_8 -SP11 は、60 mM DTT により還元後、すぐに ODS カラム (YMC-Pac ODS, SH-363-10, Φ 30 $\times$ 250 mm) とアセトニトリル-0.1% TFA 溶媒系を用いた逆相分配 HPLC に供し、還元型 S_8 -SP11 を分取し、凍結乾燥した。

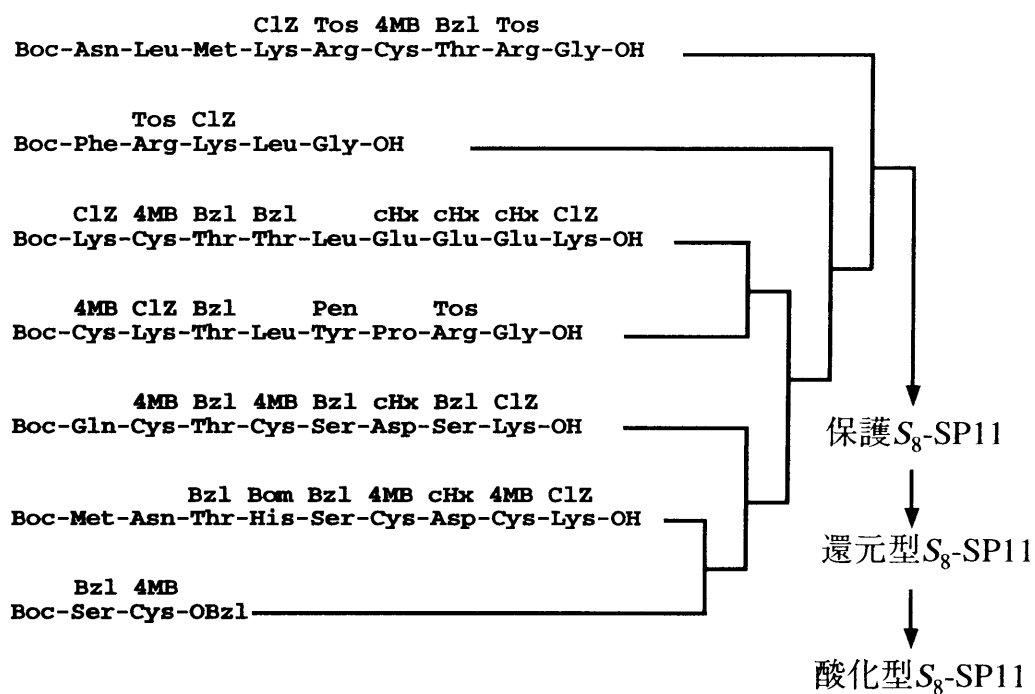


図 2 - 1 S_8 -SP11の化学合成の概略

S_9 -SP11 発現蛋白質の作製

第1章で用いた S_9 -SP11 は、N 末から 21 残基目のグルタミン残基以降の部分 を GST 融合蛋白として発現させた後、Factor Xa により GST を切り離して作製 していたが、この切断過程における S_9 -SP11 の回収率が混入してくるプロテア ーゼ等による非特異的分解のため極めて低かったので、低温条件下で切断が可 能な PreScission Protease の切断サイト有する pGEX-6P-3 ベクター (Amersham Pharmacia) に導入し直した。また、この際、花粉の S_8 -SP11 の解析結果を考慮 に入れ、25 残基目のアスパラギン残基が成熟 S_9 -SP11 の N 末端アミノ酸である と判断し、それ以降の部分と同ベクターの *Bam*HI と *Xho*I 制限酵素サイトに制 限酵素を付加した primer (forward 5'-GGATCCAATCTGAGGAAAACATGCG- 3'reverse 5'-GGGCTCGAGTCTATCTAACTTTGCATTTA-3') を用いて PCR 法に より再増幅させてから導入した。

融合蛋白質の発現と精製は、1 章：SP11 発現蛋白質の作製 (p. 26) と同様の条 件で行った。ただし、SP11 蛋白質の切り出し以降の操作は以下方法で行った。 融合蛋白質を結合させた Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を、 PreScission Protease (Amersham Pharmacia) を用いて、4℃で 2 時間穏やかに攪 拌して SP11 蛋白質と GST 間を切断した。その後、目的の蛋白質を 10 mM DTT を含む TBS buffer により還元条件下で溶出した。次に、ODS カラム (218TP510, Φ 10×250 mm, Vydac) を用いた逆相分配系 HPLC に供し、完全長の S_9 -SP11 を 含む画分を分取した。分取条件は、1 章：SP11 発現蛋白質の作製 (p. 27) と同 様だが、流速は 5 ml/min で行った。各分画の蛋白質は、MALDI-TOF-MS を用 いた分子量解析を行い、完全長の S_9 -SP11 を含むことを確認した。

酸化型 SP11 の調製

凍結乾燥した上記精製蛋白質である還元型 S_8 -SP11 及び S_9 -SP11 を、50 mM NH_4OAc (pH 7.8) によって 31 μ M に溶解し、還元型グルタチオン (終濃度 3.1 mM) と酸化型グルタチオン (終濃度 0.31 mM) を 10:1 の割合で加え、4℃で 2 日間穏やかに攪拌して酸化させた。次に、このサンプルを再度 ODS カラム (218TP54, Φ 4.6×250 mm, Vydac) を用いて分取した。分取条件は、1 章：SP11 発現蛋白質の作製 (p. 27) に従った。紫外吸収ピーク (UV_{220}) 毎に蛋白質蛋白質 を分取し、MALDI-TOF-MS による詳細な分子量測定を行い、SP11 の酸化状 態を確認した。

花粉管伸長を指標としたバイオアッセイ

B. rapa S₈、S₉ ホモ系統の柱頭に、SP11 の 0.05% Tween20 溶液 0.5 μ l を処理して、室温で 1 時間乾燥させた。次に、柱頭に和合花粉を受粉させた後、20℃で 6 時間静置した。その後、柱頭を、エタノール-酢酸 (3:1) で 2 時間固定し、次いで 1 N NaOH 中で、60℃、1.5 時間組織を浸し、アルカリ処理を行った。その後、0.01% (w/v) アニリンブルーを含む 2% (w/v) K₃PO₄ 水溶液に 2.5 時間浸してカロースの染色を行った。花粉管の観察は、蛍光顕微鏡 Axiophot 2 (Zeiss) を用い、395 nm 青色励起光下で行った。なお、10 本以上の花粉管の花柱への侵入が認められた場合に、和合受粉であると判定した。

2-3 結果

SP11 蛋白質の免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析を進めるに当たり、まず大腸菌を用いて発現させた S_8 -SP11 の GST 融合蛋白質に対する抗体をウサギを用いて作製した。さらに、得られた抗血清を GST- S_9 -SP11 および GST- S_8 -SP11 を固定化したカラムに順次供し、後者にのみ結合する IgG 画分を回収することで S_8 -SP11 特異抗体を得た。

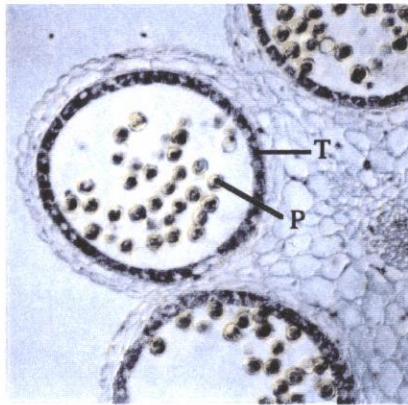
得られた S_8 -SP11 特異抗体を用い、SP11 の遺伝子発現が認められた時期 (stage 5) の葯切片に対し免疫染色を行ったところ、 S_8 系統の葯のタペート組織と花粉が特異的に染色された (図 2-2)。この染色パターンは、先述の *in situ* ハイブリダイゼーションにおける染色パターンと同一であり (図 1-10)、SP11 がこれら両組織で生産されていることが蛋白質レベルでも確認された。

さらに、電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的解析では、この時期のタペート組織と花粉の細胞内部に認められていた SP11 の抗原性が (data not shown)、成熟花粉においては、主に花粉表層物質 (pollen coat) 中に局在する様子が観察された (図 2-3)。

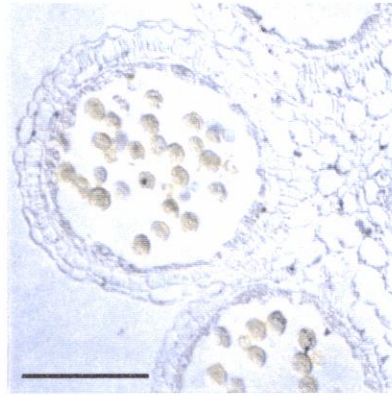
花粉 SP11 蛋白質の精製と構造解析

上記解析により、SP11 蛋白質は成熟花粉の花粉表層物質 (pollen coat) に含まれていることが示され、この花粉表層の SP11 が花粉側 S 因子の本体であり、受粉時に乳頭細胞上に放出され、その役割を果たしているものと考えられた。また、SP11 は、塩基性の小型蛋白質であり、花粉表層物質中に含まれる他の PCP 類と類似した性状を有することが期待された。

これまで PCP 類は、花粉から一般にシクロヘキサンを用いて抽出されてきたが (Doughty et al., 1993)、当研究室の浅野は、葯全体を 1 N 酢酸中で攪拌することで飛躍的に PCP 類の収量が増大することを見出した (浅野, 1999)。そこで、筆者も本方法に従って PCP 類を抽出すると共に、寒川らの方法に従い、陽イオン交換樹脂を用いて強塩基性ペプチド画分を回収した (寒川, 1991)。さらに、この強塩基性ペプチド画分を S_8 -SP11 特異抗体を用いた免疫沈降に供することにより、 S_8 -SP11 を精製した。免疫沈降物質を、SDS-PAGE 電気泳動によって分離し、解析したところ、 S_8 系統の葯からの精製物質中にのみ約 7 kDa の蛋白質が特異的に検出され、さらにウエスタンブロット解析により、本蛋白質



S_8S_8



S_9S_9

図 2 - 2 抗 S_8 -SP11特異抗体を用いた葯の免疫染色

S_8 及び S_9 ホモ系統の葯 (Stage 5, 図 1 - 9 参照) を抗 S_8 -SP11特異抗体を用いて免疫染色した。T, タペータム組織、P, pollenをそれぞれ示した。スケールバーは100 μ mを示す。

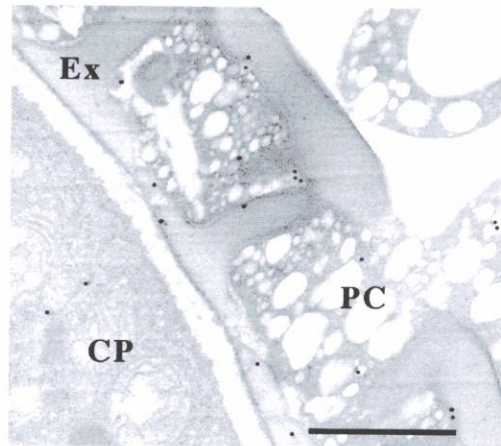


図 2 - 3 抗 S_8 -SP11特異抗体を用いた花粉の免疫電顕像

S_8 ホモ系統の成熟花粉切片に抗 S_8 -SP11抗体（一次抗体）と金コロイド（20 nm）標識した抗ウサギIgG抗体（二次抗体）を反応させた。CP, cytoplasm; Ex, exine; PC, pollen coat。スケールバーは1 μ mを示す。

が S_8 -SP11 であることが示された (図 2-4)。

更に、この免疫沈降物質を非還元条件下で回収し、MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) に供したところ、 m/z 5,717 に $(M+H)^+$ と帰属されるイオンピークが観察された (図 2-5)。この結果は、花粉表層中の S_8 -SP11 が推定された位置でシグナルペプチドが除去された後に (図 1-4)、8 つの Cys 残基が全て分子内でジスルフィド結合を形成した酸化型のモノマーの構造をとっていることを強く示唆した。

酸化型 SP11 の作製

花粉から精製される SP11 の量は極めて少量であり、天然物を使って SP11 の構造や機能をさらに解析することは出来なかった。そこで、人工的に活性型の SP11 を調製することを考えた。

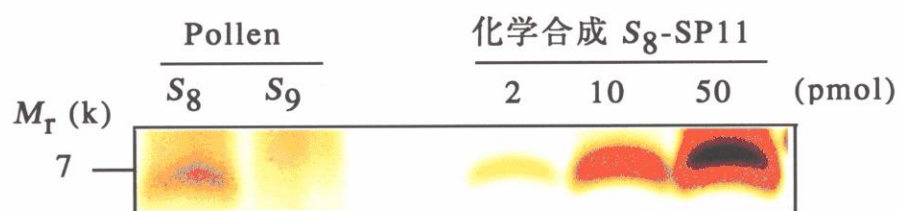
一般に、蛋白質のコンフォメーションはアミノ酸配列によって決まっており、自由エネルギーが最小となるようにポリペプチド鎖が折り畳まれる。これは *in vitro* においても同様であり、特にシステイン残基に富む細胞外蛋白質の場合は、穏和な酸化条件下でジスルフィド (S-S) 結合を架け換えながら、徐々に安定な正しいコンフォメーションを形成していくことが知られている (Creighton, 1992)。そこで筆者は、まず化学合成により S_8 -SP11 を、また大腸菌の発現系を用いて S_9 -SP11 を調製し、これらを一度還元型に変換した後、酸化還元緩衝液系 (Tsuiji et al., 1987) において徐々に再酸化させることを試みた。

酸化させた S_8 -SP11 および S_9 -SP11 を逆相分配系 HPLC に供したところ (図 2-6)、 S_8 -SP11 は 1 つの主要ピーク (8-1) を与えたのに対し、 S_9 -SP11 は 2 つの主ピーク (9-1, 9-2) を含む複数のピークを与えた。MALDI-TOF-MS を用いて詳細な分子量解析を行ったところ、 S_8 -SP11 のピーク 8-1 は、8 つのシステイン残基がすべて分子内 S-S 結合した酸化型であることが確認された。一方、 S_9 -SP11 のピーク 9-1 と 9-2 と、さらに隣接する 9-3 は、いずれも同一の分子量を示し、8 つのシステイン残基が分子内 S-S 結合をとった酸化型であるものの、S-S 結合の架かり方が相互に異なる異性体 (isomer) であることが示唆された。

酸化型 SP11 の生物活性

さて、上で得られた酸化型 S_8 -SP11 の主要ピーク 8-1 が S_8 -SP11 の活性本体であるのかどうか、また酸化型 S_9 -SP11 のピーク 9-1~9-3 のいずれが活性本体で

A



B

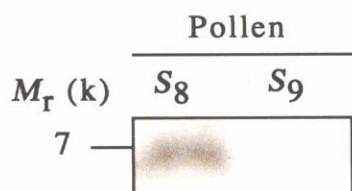


図 2 - 4 花粉抽出物からの S_8 -SP11 の精製

S_8 、 S_9 ホモ系統の葯抽出物を抗 S_8 -SP11特異抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降画分を還元条件下 (50 mM DTT) において SDS-PAGE電気泳動後、銀染色 (A) 及び、抗 S_8 -SP11特異抗体を用いたウエスタンブロット法 (B) により検出した。1レーン当たり500花相当分の免疫沈降画分を泳動した。

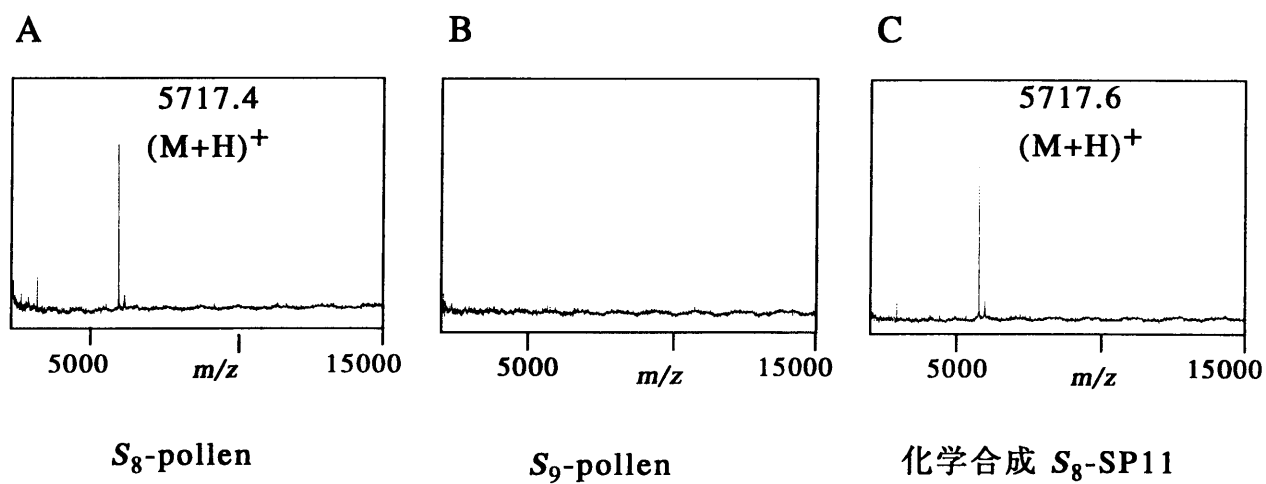


図 2 - 5 S_8 -SP11のマスペクトル

S_8 、 S_9 ホモ系統株由来の薬抽出物の、抗 S_8 -SP11抗体による免疫沈降画分をMALDI-TOF-MSにより分析した (A及びB)。化学合成により調製した酸化型 S_8 -SP11 (C)。

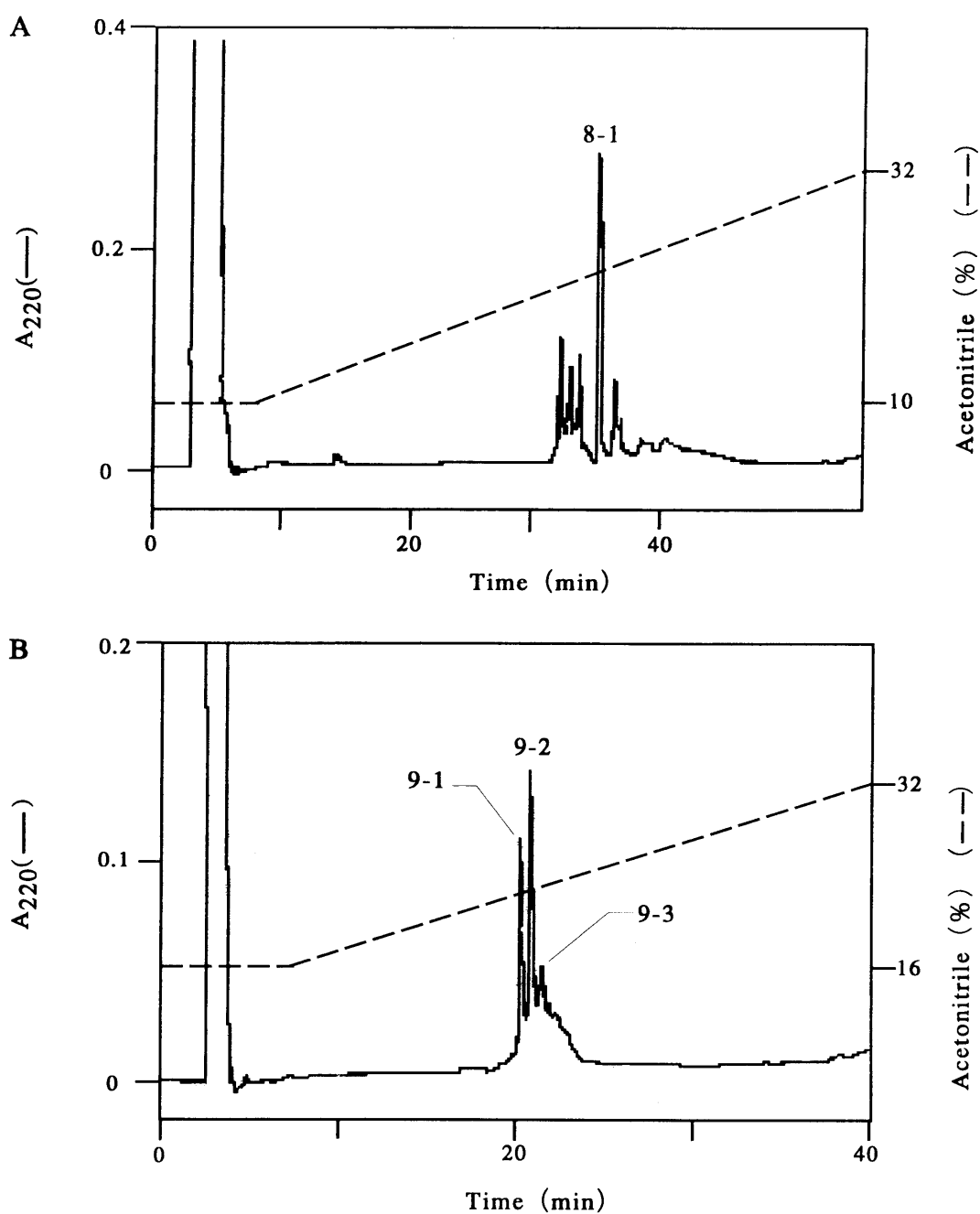


図 2 - 6 逆相HPLCによる酸化型SP11の精製

化学合成 S_8 -SP11 (A) と大腸菌発現 S_9 -SP11 (B) の酸化物をODSカラム (218TP504, $\Phi 4.6 \times 250$ mm, Vydac) を使い、0.1% TFA中のアセトニトリル濃度を10%又は16%から32%まで上昇させるグラジエント溶出 (流速 1 ml/min) により精製した。

あるのかを確認するために、バイオアッセイ系を用いて生物活性を測定することにした。

しかし、1章で使用した Stephenson らのバイオアッセイ系は、マイクロマニピレーターを使用して乳頭細胞を一つずつ被検試料で処理し、同じ場所に花粉を受粉させ、花粉の吸水を指標に活性を判定するというものであったために、操作が煩雑である上に時間がかかり、多数の被検試料を検定するには問題があった。また、生物活性を定量化することも困難であると予想された。そこで、被検試料を乳頭細胞の一つずつ処理するのではなく、マイクロピペットを用いて柱頭全体に処理することとし、また柱頭全体に受粉させて、花粉管の柱頭・花柱への侵入・伸長を指標に活性を判定することにした。また、これまで乳頭細胞の限定された部位に被検試料を処理するために、被検試料を粘性の花粉表層物質 (pollen coat) と混合してから処理していたが、被検試料の 0.05% Tween20 水溶液を直接柱頭全体に処理することにした。なお、(不)和合の判定は、アニリンブルーにより染色した花粉管を蛍光顕微鏡下で観察することにより行い、花柱に侵入した花粉管の数が 10 以上の場合を和合と判定した。(図 2-7)。

この新しいアッセイ系を用いて、酸化型 SP11 の生物活性を測定したところ、 S_8 -SP11 のピーク 8-1 と S_9 -SP11 の主要ピーク 9-1 が、 S 遺伝子特異的かつ濃度依存的に和合花粉の花粉管の侵入・伸長を阻害することが示された(図 2-8)。この結果は、これらの酸化型 SP11 が花粉側 S 因子の活性本体であることを強く示唆するものである。また、本アッセイ系において、 S_9 -SP11 のピーク 9-2 と 9-3 は、柱頭当り 500 fmol 量処理しても、全く活性を示さなかった。このことは、特定の S - S 結合を持つ酸化型 SP11 が、花粉側 S 因子として機能する上で重要であることを示唆するものであった。

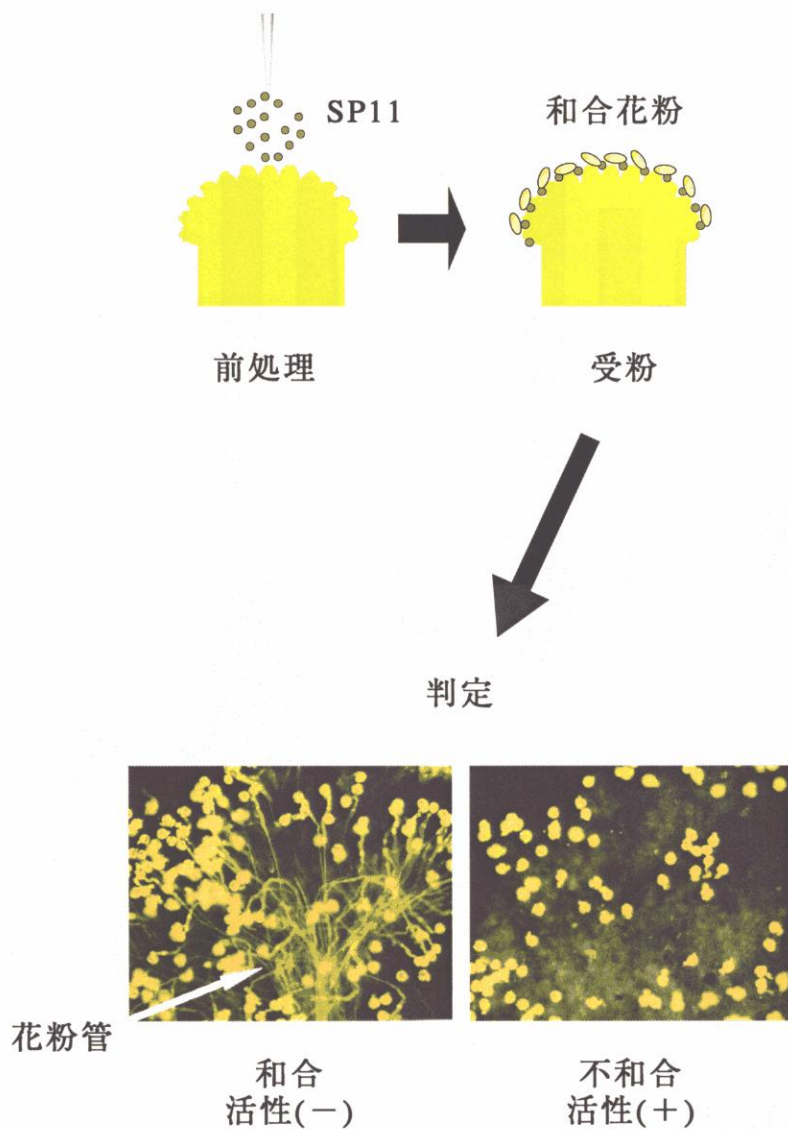


図 2 - 7 花粉管の侵入・伸長を指標とした花粉側S因子のバイオアッセイ法

柱頭をSP11試料を含む0.05% Tween 20溶液で処理し、乾燥後、和合花粉を受粉させた。和合、不和合の判定は、花粉管の柱頭、花柱への侵入を指標に行い、10本以上の花粉管の侵入が認められた場合に和合と判定した。

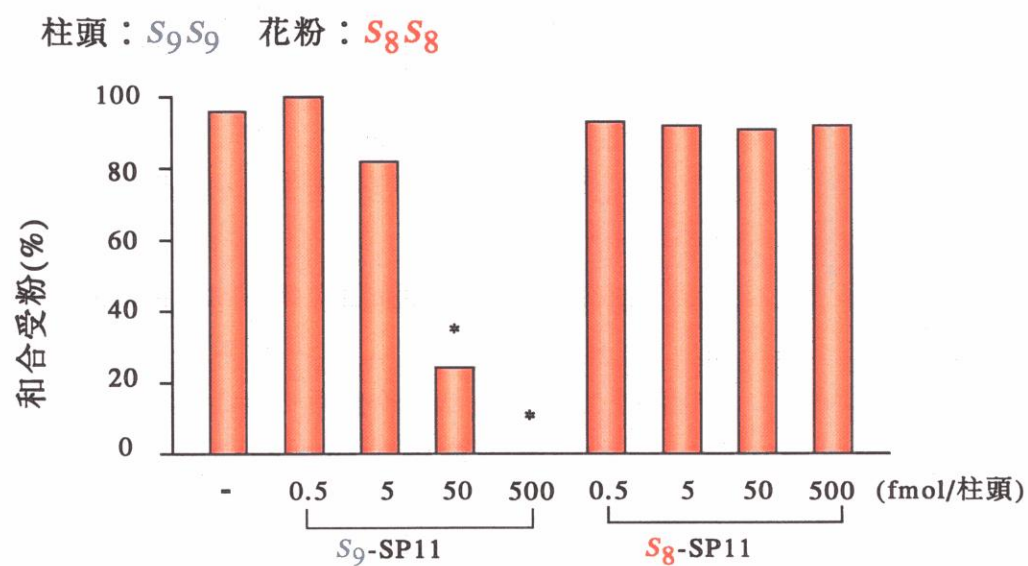
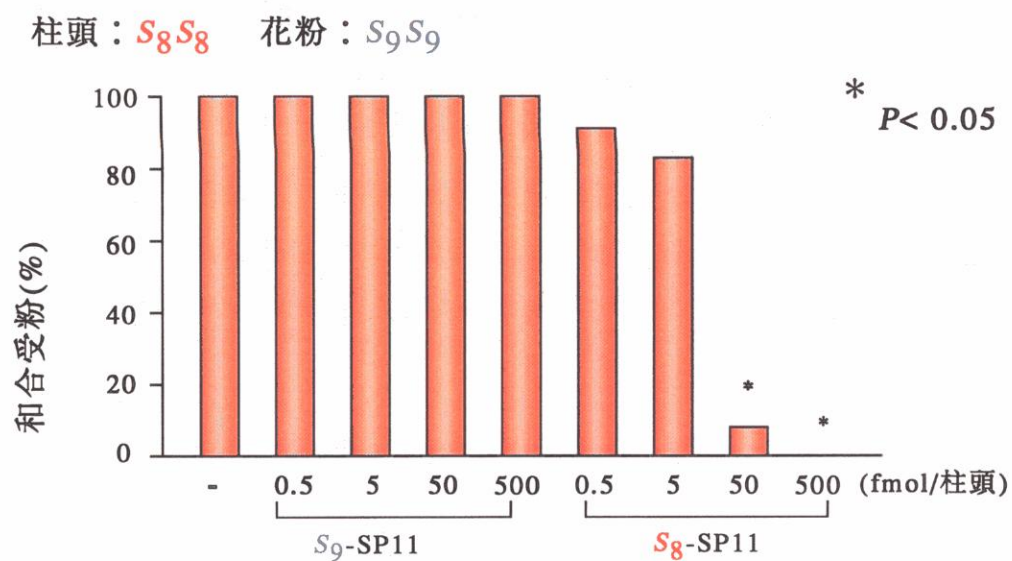


図 2 - 8 酸化型SP11の生物活性

柱頭を酸化型 S_8 -SP11、あるいは酸化型 S_9 -SP11 (0.5, 5, 50 fmol/柱頭) で処理した後、和合花粉を受粉させた時の和合受粉の確立を示した。—は、0.05% Tween 20のみを処理した場合 (コントロール) を示した。

2-4 考察

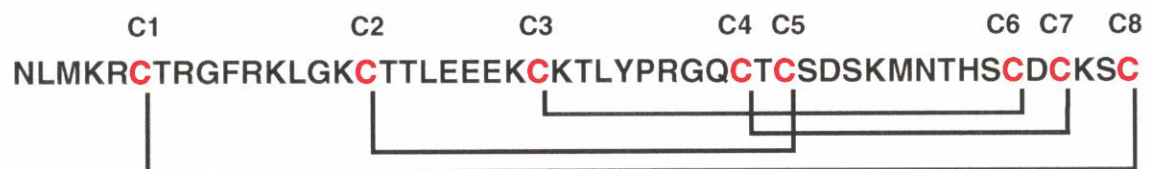
本章においては、まず免疫組織化学的解析を行い SP11 が葯のタペート組織および花粉で合成されていることを蛋白質レベルで確認すると共に、成熟花粉では SP11 が花粉表層に局在することを明らかにした。これらの観察結果は、タペート組織と花粉において生合成された SP11 が、花粉の成熟に伴い花粉表層に移行することを示唆するものであり、また花粉側 S 因子が花粉表層物質中に存在することを示した Stephenson らの実験とも合致する結果であった (Stephenson et al., 1997)。

さらに免疫沈降法により花粉の SP11 を単離し、質量分析を通じ、この SP11 が予想される位置でシグナルペプチドが除去された後に 8 つのシステイン残基がすべて分子内ジスルフィド (S-S) 結合を形成した酸化型のモノマー構造をとっていることを明らかにした。また、化学合成あるいは大腸菌を用いた発現系により作製した SP11 を穏和な条件下で酸化させることで酸化型 SP11 を作製することに成功した。更に、得られた酸化型 SP11 の内、ある特定の S-S 結合を有する分子種が、実際に、花粉側 S 因子としての生物活性を示すことを新たに開発したバイオアッセイ系を用いて証明した。

今回、酸化型 S_8 -SP11 の主要成分 (8-1) と、酸化型 S_9 -SP11 の主要成分の一つ (9-1) に活性が認められたことから、この構造をとりうる分子内の S-S 結合が活性に重要であることが示唆された。そこで、高山は、この内 S_8 -SP11 の S-S の結合位置を、プロテアーゼ処理によって得た S_8 -SP11 ペプチド断片の MALDI-TOF-MS 解析とアミノ酸配列解析から、図 2-9 のように決定した。SP11 は、defensin 類と 4 番目のシステイン残基 (C4) の位置が大きく異なるが、S-S 結合の (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7) 架かり方は、立体構造が明らかにされている Rs-AFP1 などの植物 defensin 類と同じであった (Fant et al., 1998)。

一方、活性を有する酸化型 S_9 -SP11 (9-1) に関しては、その S-S 結合位置については、未だ決定されていない。また、 S_9 -SP11 の酸化反応時に、活性型の S_9 -SP11 (9-1) と同時に同一の分子量を持つ S_9 -SP11 (9-2 および 9-3) が得られたが、これらには花粉側 S 因子としての生物活性は全く認められなかった。これら 3 つの酸化型 S_9 -SP11 は、S-S 結合の架かり方の異なる isomer の関係にあると推定されるが、それぞれどのような構造を持つのか大変興味深い。

S_8 -SP11



Rs-AFP1

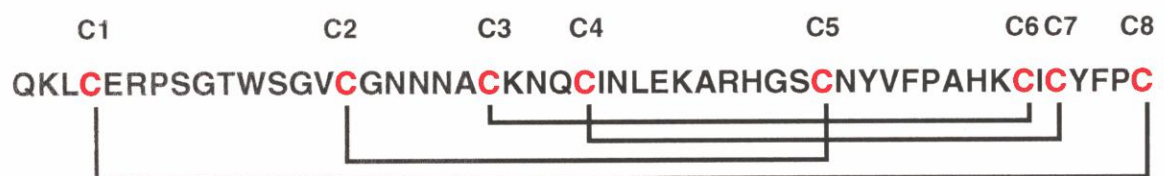


図 2 - 9 SP11とPlant defensin (Rs-AFP)のジスルフィド結合の比較

(S_8 -SP11, Takayama et al., 2001; Rs-AFP1, Fant et al., 1998)

SP11 の機能を蛋白質構造化学的に解析していくためには、SP11 の S-S 結合を含めた 1 次構造のみならず、立体構造について明らかにしていく必要がある。本章において調製した酸化型 S_8 -SP11 (8-1) が、NMR による解析により、水溶液中で一定の安定なコンフォメーションをとっていることが示され、現在立体構造の解明に向けて解析を継続中である (佐々木, 2001)。

動物の受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの中には、システイン残基に富む構造のものが少なくない。これらシステイン残基は分子内あるいは分子間で S-S 構造を形成することで、活性型のリガンドの構造の安定化に寄与しているものと考えられる。例えば、細胞増殖因子を例にとってみると、EGF (epidermal growth factor) は分子内の 3 つの S-S 結合で安定化された単量体として存在し、機能している。一方、TGF- β (transforming growth factor β) や PDGF (platelet-derived growth factor) は、分子内に加え分子間で特定の S-S 結合を形成した 2 量体として存在し、機能することが知られている (McDonald and Hendrickson, 1993)。

最近、Kachroo らは *B. oleracea* の花粉表層蛋白質を非還元条件下で SDS-PAGE により分離した後、ウェスタンブロット解析に供し、抗 SCR 抗体と反応するバンドの泳動位置を根拠に SCR/SP11 が 2 量体である可能性を指摘した (Kachroo et al., 2001)。しかし、筆者が本章において示してきた花粉表層蛋白質から S_8 -SP11 特異抗体を用いた免疫沈降実験及び、合成蛋白質や発現蛋白質を用いたバイオアッセイから、 S_8 -SP11 が酸化型の単量体として存在し、この構造を有するものが花粉側因子の活性本体であることを明確に示唆するものであった。

筆者らは、花粉管侵入・伸長を指標とした新たなバイオアッセイ系を構築し、単量体の酸化型 SP11 が、花粉側 S 因子としての生物活性を有することを証明した。このバイオアッセイ系においては、柱頭を予め SP11 蛋白質で処理しておくが、この段階では、処理した SP11 の大部分が乳頭細胞表層に沈着しており、乳頭細胞壁内には侵入していったいない様子が、抗 SP11 特異的抗体を用いた免疫電顕により、観察されている (data not shown)。花粉受粉時には受粉花粉直下の乳頭細胞表面の構造が大きく変化し、それと合わせて乳頭細胞壁内へ蛋白質が侵入する様子が観察されているが (Elleman, 1996)、本バイオアッセ

イ系においても、和合花粉を受粉させた段階で、受粉部位表層に沈着していた SP11 が乳頭細胞壁内へ侵入して行き不和合性反応を誘起しているものと考えられる。従って、厳密な意味で不和合性反応を誘起させるのに必要な SP11 量を本バイオアッセイ系から推察することは不可能と思われるが、柱頭に処理した SP11 量と不和合受粉率の間には明確な相関が認められたことから、本方法は今後 SP11 の構造活性相関研究など定量的な実験にも有効であると思われる。

第3章

自家不和合性における自他識別機構の解明

3 - 1 序

本研究のこれまでの解析により、SP11 が花粉表層に局在し、花粉の *S* 表現型を決定する花粉側 *S* 因子として機能していることが明らかとなった。同じく *S* 遺伝子座上にコードされる受容体型キナーゼ SRK が、柱頭細胞膜上に局在し、柱頭の *S* 表現型を決定する柱頭側 *S* 因子として機能していること (Takasaki et al., 2000) と考え合わせると、SP11 と SRK がリガンドとレセプターの関係にあることは、容易に推測できた。しかし、この推測を裏付ける実験的証拠は全く得られておらず、また両者の関係が予測通りだとしても、SP11 と SRK がそれぞれ単独でリガンドあるいはレセプターを構成しているのかという点については、何の知見も得られていなかった。さらに、*S* 遺伝子座上に一部の例外を除いて、普遍的に見出されるされるもう一つの因子 SLG は、柱頭の *S* 表現型の決定には関与しないものの自家不和合性の認識反応を補強する柱頭側因子として機能していることが示唆されたが (Takasaki et al., 2000)、その役割の実体については全く未解明であった。

そこで本章では、第 2 章において作製した SP11 を用いて生化学的な解析を行い、SP11 と SRK 及び SLG との関係を明かにし、花粉の自他認別機構を解明することを目指した。

3 - 2 材料及び方法

BIAcore を用いた相互作用解析

SP11 および SLR1-BP 蛋白質の調製

S₈-SP11 および S₉-SP11 は第 2 章で調製し、生物活性を確認した酸化型 (8-1 および 9-1) を使用した。相互作用解析のコントロールとしては、BIAcore によって SLR1 との相互作用が示された SLR1-BP1 (Takayama et al., 2000b) を、大腸菌発現系を用いて作製して用いた。成熟 SLR1-BP1 蛋白質の N 末端に相当するグルタミン以降のアミノ酸配列を GST との融合蛋白質としてさせるために、SLR1-BP1 の cDNA クローンをテンプレートとして制限酵素サイトを付加した primer (Forward 5'-GGATCCCAAAAAGGAGGACCAGTCCG-3' ; Reverse 5'-GCTCGAGTTCAACAATGATAATCGCATC-3') を用いて、成熟蛋白質コード領域を PCR 法により再増幅し、pGEM to easy vector (Promega) に TA クローニングした。次に、制限酵素 *Bam*HI と *Xho* I (TaKaRa) により切りだし、発現 vector である pGEX-6P-3 (Amersham Pharmacia) の同制限酵素サイトに導入した。発現誘導と精製は 1 章: S₉-SP11 発現蛋白質の作製 (P. 26) と同様の方法で行った。

SLG および SLR1 蛋白質の調製

BIAcore センサーチップに固定する SLG₈、SLG₉、SLR1 蛋白質は、*B. rapa* の S₈、S₉ 系統の柱頭より、高山らの方法を用いて精製した (Takayama et al., 1987)。

SRK₉-SD-GST および SLR1-GST 融合蛋白質の作製

SRK₉ の細胞外ドメイン (1~428 a.a.) のコード領域を、SRK₉ の cDNA をテンプレートに *Nde*I と *Bam*HI 制限酵素サイトを付加した primer (forward 5'-CATATGATGSSSGGTGTACG-3', reverse 5'-GGATCCAACGACATCAGCA-3') によって PCR 増幅後、TA cloning kit (Invitrogen) を用いて pCR 2.1-TOPO vector にクローニングを行い、塩基配列を確認した。次に、*Nde*I と *Bam*HI 制限酵素によって SRK₉-SD を切り出し、pESP-3 (Stratagene) の同制限酵素サイトに導入し、SRK₉-SD の C 末端に GST が融合する SRK₉-SD-GST を構築した。更に、SRK₉-SD-GST を *Nde*I と *Sma*I 制限酵素により切りだし、Blunting kit (TaKaRa) を用いて平滑末端化させ、一度 pBluscript II SK- (pBS, TOYOBO) の *Sma*I 制限酵素サイトへサブクローニングした。最後に、pBS のマルチクローニング制限

酵素 *EcoRI* と *XbaI* を利用して *SRK₉-SD-GST* を切り出し、カイコ発現用のベクターである pBK283 (日本農産工業) の同制限酵素サイトへ導入した。

SLR1-GST は、まず SLR1 をこの cDNA クローンより *KpnI*、*BamHI* 制限酵素サイトを付加した primer (forward 5'-GGTACCATGGATATCTGCAGAATTC-3',

reverse 5'-GGATCCCGAGGGGACAAGACTA-3') により PCR 増幅を行い、pCR 2.1-TOPO vector に TA クローニングし、塩基配列を確認した。次に、*SRK₉-SD-GST* が導入された pBS ベクターから、*KpnI* と *BamHI* 制限酵素処理によって *SRK₉-SD* を切り出し、代わりに *SLR1* を導入した。最後に、pBS ベクターに構築された *SLR1-GST* を *KpnI* と *EcoRI* 制限酵素によって切り出し、pBK283 ベクターの同制限酵素サイトに導入した。

これらの発現用プラスミドは、Mini prep spin kit (Qiagen) により精製し、組み換えバキュロウイルスの作製に使用した。なお、組み換えバキュロウイルスの作製は、日本農産工業に依頼した。得られた組み換えウイルス感染液 (感染力価 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ pfu/ml) $10 \mu\text{l} \sim 20 \mu\text{l}$ をカイコ (*Bombyx mori*) の 5 令幼虫に皮下注射し、 $25^\circ\text{C} \sim 27^\circ\text{C}$ で 3~4 日間飼育を行なった後、カイコ体液を回収した。体液中の GST 融合蛋白質は Glutathione Sepharose 4B を用いて精製し、anti-GST-rabbit-IgG (UP STATE) 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供して、同抗体によって検出される蛋白質の分子サイズが目的の発現蛋白質から予想されるものと一致することを確認した。

BIAcore 測定条件

BIAcore 2000 (BIAcore) 装置により、HBS-EP buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4, Amersham Pharmacia) を移動相として測定を行い、BIAevaluation 3.1 により相互作用を解析した。

上記調製蛋白質類のうち、SLG₈、SLG₉ 及び SLR1 については、CM5 センサーチップ (BIAcore) 上にアミンカップリングキット (BIAcore) を用いて 3 つの flow cell にそれぞれ直接 1000~1500 RU 固定化した。なお、残りの 1 つの flow cell は蛋白質非存在下でアミンカップリング反応のみを行い、ブランクとして用いた。また、*SRK₉-SD-GST*、*SLR1-GST* については、CM5 センサーチップ上に GST Kit for fusion capture (BIAcore) を用いて、まず GST 抗体を固定化し、その後目的の GST 融合蛋白質を固定量が 1000 RU 上昇分になるよう結合させた。また、残りの flow cell には、キット内の GST (*Schistosoma japonicum*) を

同様に固定しブランクとして用いた。

相互作用は、流速 $20 \mu\text{l/min}$ 、 25°C 下において測定した。被検試料との相互作用を測定した後は、 2 M NaCl を含む HBS buffer を流すことでセンサーチップを再生させた。

^{125}I 標識 SP11 を用いた相互作用解析

柱頭ミクロソーム膜画分の調製

B. rapa S_8 、 S_9 系統の開花当日の花より柱頭を摘出し、使用時まで -80°C に保存した。以下の操作はすべて氷上で行い、使用する buffer 類も予め冷却したものを使用した。柱頭を、homogenization buffer (50 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.5$, 250 mM sucrose , 10 mM DTT , protease inhibitor cocktail; Roche) 中で乳鉢・乳棒によって破碎した。破碎液を遠心分離 ($8,000 \times g$, 15 min , 4°C) し、その上清を更に超遠心分離 ($120,000 \times g$, 60 min , 4°C) に供することで可溶性画分とミクロソーム膜画分とに分画した。ミクロソーム膜画分は、homogenization buffer に再懸濁・再度超遠心することで洗浄した。得られたミクロソーム膜画分は、suspension buffer (10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.5$, 250 mM sucrose , $20 \% \text{ glycerol}$, $0.1 \% \text{ BSA}$) に懸濁し、 -80°C で保存した。ミクロソーム膜画分中の蛋白濃度は、BCA kit (Pierce) により求めた。

柱頭細胞膜画分の調製

上記柱頭ミクロソーム膜画分を polyethylene glycol (PEG) と dextran を用いた水相二層分配法 (Larsson et al., 1987) によって、plasma membrane rich fraction まで精製し、これを柱頭細胞膜画分として使用した。

^{125}I - S_8 -SP11 の調製

S_8 -SP11 2 nmol を、Iodo-gen pre-coated tube (Pierce) を用いて 10 mCi の ^{125}I (105 mCi/ml , Amersham Pharmacia) により放射性標識した。標識後、Auto-gamma COBRA IITM (Packard) により計測された ^{125}I - S_8 -SP11 の比活性は、 6.1 TBq/nmol であった。

ヨウ素化 SP11 が、生物活性を保持しているかを検定するために、非放射性 NaI を用いて上と同じ操作により調製した $\text{I-}S_8\text{-SP11}$ を ODS カラム (218TP54, $\Phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$, Vydac) を用いて分離・精製した。精製した蛋白質は、MALDI-

TOF-MS による分子量測定により、蛋白質にヨウ素が一つ付加されていることを確認し、二章のバイオアッセイ法を用いて生物活性を確認した。

¹²⁵I-S₈-SP11 を用いた結合実験

柱頭ミクロソーム膜画分 100 μg (蛋白質) を 100 μl の 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 0.1M sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, Protease inhibitor cocktail (Roche) に再懸濁し、氷上で 30 分間プレインキュベートした。次に、¹²⁵I-S₈-SP11 を終濃度が 40 nM からの 2/3 希釈系列 (0.69 nM~40 nM) となるように添加し、氷上で 90 分間平衡化させた。その後、遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4℃) により膜画分を分離し、buffer で洗浄した後に、結合している ¹²⁵I-S₈-SP11 の放射活性を Auto-gamma COBRA II™ により測定した。また、¹²⁵I-S₈-SP11 を添加する際に非標識の S₈-SP11 を同時に 100 倍量添加した際に膜画分に回収される放射活性を、非特異的な結合量とした。

SP11 結合柱頭膜蛋白質の解析

化学架橋実験

柱頭ミクロソーム膜画分 100 μg に ¹²⁵I-S₈-SP11 を 10 nM 添加して結合反応を、上記と同様に行った。ただし、使用した buffer は BSA を除いたものを使用した。結合反応後、終濃度が 1 mM となるように化学架橋剤 bis[sulphosuccinimidyl] suberate (BS³, Pierce) を添加し、室温で 30 分間反応させて蛋白質間の架橋を行った。その後、遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4℃) により得られた膜画分を SDS sample buffer 中 95℃、5 分間熱処理し、4~12% ポリアクリルアミドグラジエントゲル (TEFCO) を用いた SDS-PAGE に供した。泳動後のゲルは固定液 (30% MeOH, 10% acetic acid) 中で 15 分間振とう後、乾燥させ、BAS2000 (Fuji) を用いて解析した。

抗 SRK 抗体および抗 SLG 抗体の作製

今回、SRK 及び SLG に対する抗体は以下の 3 種類を使用した。

1. SLG₈ に対するモノクローナル抗体。
2. SRK₈ の C 末端ペプチド (DDESWTVNKYTCVSVIDAR) に対するポリクローナル抗体。
3. SRK₈-S domain (SRK₈-SD) の大腸菌発現蛋白質に対するポリクローナル抗

体。

1 番目の SLG₈ モノクローナル抗体は、柱頭より精製した SLG₈ をマウスに免疫して作製されたもので、柱頭の SLG₈ をリジルエンドペプチダーゼ処理して得られる N 末端から 45 残基までのペプチド断片を特異的に染色することが示されている (松木, 1992; Shiba et al., 2000)。

2 番目の SRK₈ ペプチド抗体は、SRK₈ の C 末端のアミノ酸配列を基に設計した合成ペプチド (Ac-DDESWTVNKYTC SVIDAR-COOH) をシステイン残基を介して KLH とコンジュゲートさせたものをウサギに免疫して作製した。得られた抗血清から硫酸沈澱により IgG 画分を回収しした後に、同合成ペプチドを SulfoLink Kit (Pierce) を固定化したカラムに供することで、特異的抗体を精製した。

3 番目の SRK₈-SD 抗体は、SRK₈-S domain の大腸菌発現蛋白質をウサギに免疫して作製した。まず、SRK₈-SD (30~435 アミノ酸残基) のコード領域を primer (forward :5'-GGATCCATCGAAGGTCGTATCTATATCAACACTTTGTCC-3'、reverse 5'-GGTACCTCAAACAAGATCAGCGGCAGCCA-3') を用いて SRK₈ の cDNA クローンを鋳型に PCR 法により増幅後、直接 pCR T7/NT-TOPO vector (Invitrogen) に導入した。この発現 vector は、目的蛋白質の N 末端に 6xHis タグが付加されるように設計されている。これを用いて大腸菌 BL21[DE3]pLysS (Invitrogen) を形質転換し、1 章: SP11 発現蛋白質の作製 (p, 26) と同じ条件で目的蛋白質を発現させた。発現蛋白質は、B-PER (Pierce) では可溶化されなかった不溶性画分を、6 M guanidine-HCl, 50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 μg/ml pepstatin A, 2 μM leupeptin, pH 7.4 中で超音波処理することにより抽出した。遠心分離 (9000 rpm, 15 min, 4℃) により得られた上清を TAILON Cell Thru beads (Clontech) キレートカラムに供し、目的の SRK₈-SD を 150 mM イミダゾールを含む 6 M guanidine-HCl, pH 7.4, 50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol により溶出した。回収された SRK₈-SD は、透析カセット (Slide-A-Lyzer, Pierce) を用いて、8 M urea, 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 溶液中で緩衝液置換してから直接ウサギに免疫した。得られた抗体は、硫酸沈澱法により IgG 画分を回収後、同融合蛋白質を固定化した Hi-Trap NHS-activated column (Amersham Pharmacia) によりアフィニティー精製した。

免疫沈降法

上記化学架橋実験 (p. 79) と同じ方法で架橋した膜画分 (1 mg 蛋白質) を、1 % SDS を含む 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl を 100 μ l 添加して膜蛋白質を可溶化した。この溶液に 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1% Na deoxycholate を 900 μ l 加えた後に遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4°C) し、得られた上清を免疫沈降実験に供した。また、架橋膜画分 (1 mg 蛋白質) を SDS 溶液の代わりに 1% Triton X-100 を含む Binding buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 0.1M sucrose, 5 mM MgCl₂, Protease inhibitor cocktail, Roche) 100 μ l で抽出した場合には、抽出液を 10 倍量の Binding buffer で希釈後、遠心分離によって得られた上清を免疫沈降実験に供した。得られた膜蛋白質抽出液を免疫沈降実験に供する前に、まず rProtein A Sepharose FF あるいは Protein G Sepharose FF (Amersham Pharmacia) を 10 μ l 添加し、4°C で 1 時間転倒混和することで、これらの樹脂と非特異的に結合する膜蛋白質を除去した。その後、各種抗 SRK/SLG 抗体を 2 章: 免疫沈降法による SP11 蛋白質の精製 (p. 55) と同じ方法で予め架橋した Protein A (or G) Sepharose を 10 μ l 添加し、4°C で 2 時間転倒混和した。遠心分離により回収した樹脂を直接 SDS-PAGE に供し、泳動後のゲルを固定・乾燥後、BAS2000 により解析した。

SRK 自己リン酸化の解析

柱頭細胞膜画分 (2 μ g 蛋白質) を reaction buffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, Protease inhibitor cocktail) に懸濁し、10 nM SP11 存在下、非存在下において 90 分間氷上で反応させた。反応後、遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4°C) により細胞膜画分を回収し、0.5% Nonidet P-40 により膜蛋白質を可溶化した。その後、SRK₈ の C 末端ペプチド抗体により、免疫沈降を行った。沈降後の Sepharose beads は reaction buffer で洗浄後、0.33 μ Ci/ μ l の [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia) を含む phosphorylation buffer (10 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 μ M microcystin LR, 1 μ M okadaic acid in reaction buffer) に懸濁させ、氷上で 5 分間反応させた。その後、20 mM EDTA を含む phosphorylation buffer で 1 回、500 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 で 3 回洗浄し、遊離の [γ -³²P]ATP を除去した。³²P 標識された SRK を、SDS-PAGE により分離後、BAS2000 により解析した。

動物細胞を用いた SRK および SLG の一過性発現

SRK₈ 発現ベクターを構築するために、SRK₈ の cDNA クローンをテンプレートに、開始コドン 3 塩基上流から終止コドンの直前までの領域を、primer (forward: 5'-GAAATGGAAGGTGTACGATACATC-3', reverse: 5'-CCGGGCATCGATGACTGA-3') を用いて PCR 法により再増幅した。なお、発現効率を上げる為に、kozak のルールに沿うように forward primer に変異を導入した。PCR 増幅断片は、直接発現ベクターである pEF6/V5-His TOPO (Invitrogen) へクローニングした。このベクターでは、目的蛋白質の C 末端に 6×His が付加される。SLG₈ の発現ベクターは、pSG-5 (Invitrogen) の *EcoRI* と *BamHI* サイトに cDNA を導入して構築した。構築した発現ベクターは、Mini prep spin kit (Qiagen) を用いて精製してから、Lipofect Amine2000 (Gibco) を用いて COS-7 細胞へ導入した。形質転換 COS-7 細胞は、培養液 [D-MEM, 10% fetal bovine serum (Gibco), 50 µg/ml streptomycin (Gibco), 50 units/ml penicillin (Gibco)] 中、37℃、5% CO₂ 条件下で約 48 時間培養した。この細胞を、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, Protease inhibitor cocktail 中で超音波破碎し、超遠心 (120,000×g, 60 min, 4℃) により細胞ミクロソーム膜画分を回収して実験に使用した。

柱頭 SP11 受容体複合体の精製

N 末端をビオチン化した S₈-SP11 (Biotin-S₈-SP11) を化学合成し (ペプチド研究所)、これを用いて柱頭抽出物より SP11 受容体複合体を精製した。*B. rapa* S₈、S₉ 系統の柱頭を、10 nM Biotin-S₈-SP11 を含む 50 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 10 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate, 10 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 100 mM NaCl, 0.005% Triton X-100 溶液中で乳鉢乳棒によって破碎した。破碎液は、遠心分離 (120,000×g, 60 min, 4℃) により、可溶性画分とミクロソーム膜画分に分離した。その後、可溶性画分と 1% Triton X-100 により可溶化したミクロソーム膜画分に、Streptavidin Sepharose (Amersham Pharmacia) を加えて、1 時間、4℃で転倒混和し、Streptavidin Sepharose と共に共沈する蛋白質を回収した。回収された蛋白質は、SDS-PAGE 後、銀染色、もしくはウエスタンブロット法により解析した。

3-3 結果

BIAcore を用いた相互作用解析

SP11 が SLG あるいは SRK の細胞外領域 (*S*-domain) と直接相互作用するかどうかを、BIAcore (表面プラズモン共鳴センサー) を用いて解析した。

まず、センサーチップ上に、柱頭より精製した SLG₈、SLG₉ をアミンカップリング法により固定した。また、SLG と相同な柱頭蛋白質で花粉と柱頭の接着に関与することが示唆されている SLR1 (Luu et al., 1997) も柱頭より精製し、コントロールとして同様に固定した。このセンサーチップ上に、第2章において調製した酸化型 S₈-SP11 および S₉-SP11、さらに SLR1 との相互作用を指標に花粉より単離されてきた SLR1-BP1 (図1-4 参照; 浅野, 1999; Takayama et al., 2000b) の発現蛋白質を注入し、相互作用を解析した。その結果、この系のコントロールとして用いた SLR1-BP1 は SLR1 に対し特異的に強い結合活性を示したが、S₈-SP11 および S₉-SP11 は、いずれの SLG に対しても解析を行った 100 nM までの濃度域において、全く結合活性を示さなかった (図3-1 A)。

次に、SRK₉ の *S*-domain を GST (glutathione *S*-transferase) との融合蛋白質としてカイコ幼虫に発現させ (SRK₉-SD-GST)、GST を介してセンサーチップに固定した。コントロールとして SLR1 の GST 融合蛋白質 (SLR1-GST) も同様に発現させ、同じセンサーチップ上に固定した。その結果、この SLR1-GST に対し、SLR1-BP1 は結合活性を示した。このことは、カイコによる発現系が SLG 様の構造を持つ SLR1 の発現に有効であることを示している。しかし、SRK₉-SD-GST に対しては、S₈、S₉-SP11 は全く結合活性を示さなかった (図3-1 B)。

以上の結果は、SP11 が単独の SLG や SRK-SD に対しては結合しないことを示唆するものであった。しかし、固定化蛋白質がアミンカップリングの際に失活してしまった可能性や、異種細胞で発現させた SRK-SD に関しては、翻訳後修飾等の違いにより結合活性を示さなかった可能性も残された。さらに最近、ロイシンリッチリピート型の細胞外領域を有する2つの植物受容体型キナーゼ、CLAVATA1 (CLV1) および FLS2 において、活性型のキナーゼ領域の存在が、リガンド分子 [CLV3 および flagellin peptide (flg22)] との結合にも必須であることが相次いで報告された (Trotochaud et al., 2000; Gomez-Gomez et al., 2001)。SRK と SP11 との結合には SRK の活性型のキナーゼ領域の存在が必須なのかも

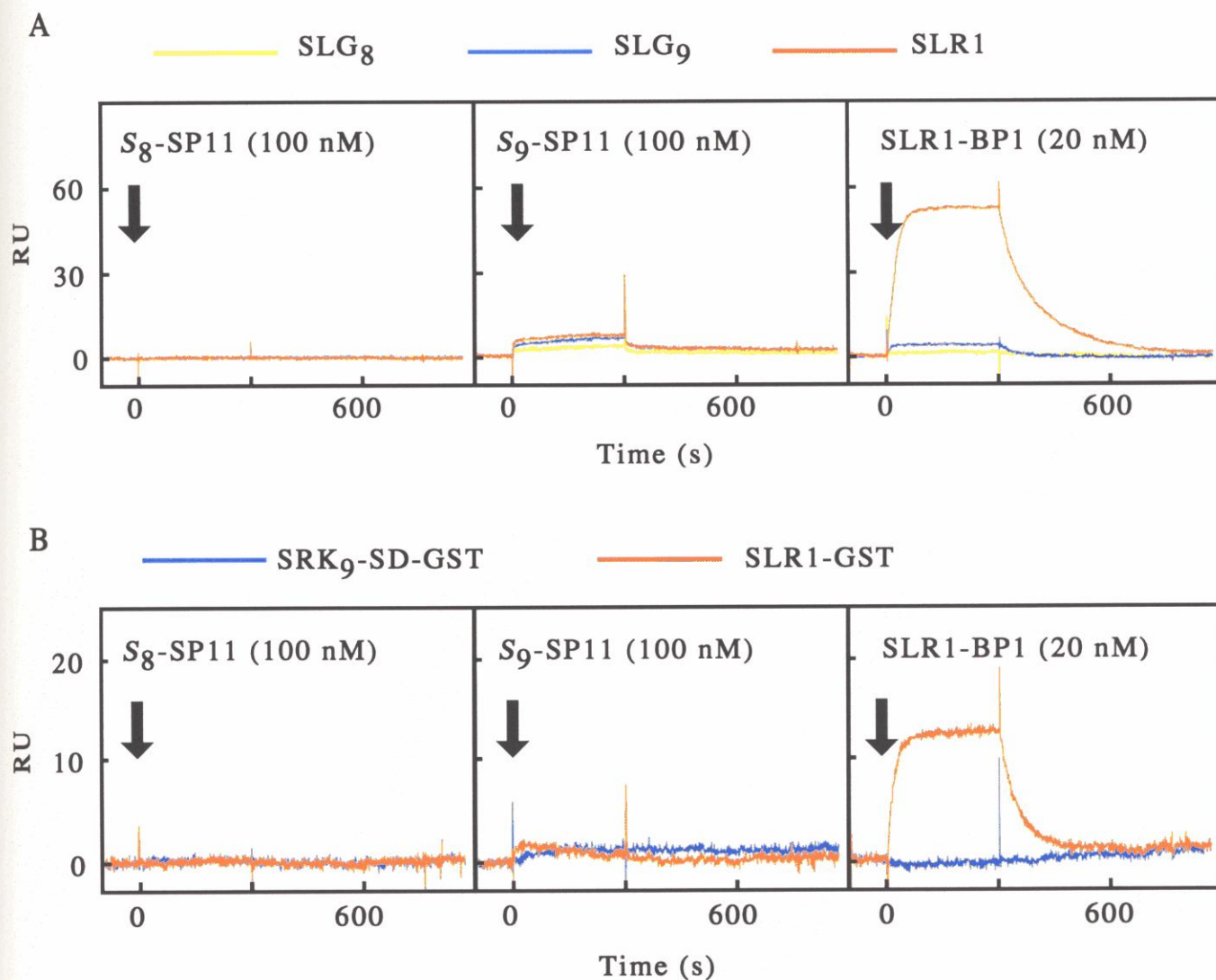


図 3 - 1 BIAcoreを用いた相互作用解析

(A) : SLG₈、SLG₉、SLR1を固定化したセンサーチップに、300 秒間S₈-SP11、S₉-SP11及びSLR1-BP1を注入した時のセンサーグラムを示した。なお、蛋白質を固定していないflow cellのセンサーグラムをバックグラウンドとして差し引いて示した。

(B) : SRK₉-SD-GST、SLR1-GST融合蛋白質を抗GST抗体を介して固定化したセンサーチップにAと同じ試料を注入したときのセンサーグラムを示した。バックグラウンドとしてGST蛋白質を固定したflow cellのセンサーグラムを差し引いて示した。

しれない。

¹²⁵I 標識 SP11 を用いた相互作用解析

次に、SP11 を放射性標識し、柱頭のマクロソーム膜画分に対する結合活性を解析することにした。 S_8 -SP11 は、28 残基目にチロシンを有することから、この残基を Iodogen を触媒として ¹²⁵I で標識した。なお、同方法でヨウ素標識した S_8 -SP11 (I - S_8 -SP11) が、非標識の S_8 -SP11 と同程度の生物活性を有することを第 2 章のバイオアッセイ系を用いて確認した (Takayama et al., 2001)。

S_8 および S_9 系統の柱頭より調製したマクロソーム膜画分に約 0.7 nM~40 nM の放射性標識 S_8 -SP11 (¹²⁵I- S_8 -SP11) を添加し、一定時間平衡化させた後に、遠心分離により膜結合型 (Bound) と遊離型 (Free) ¹²⁵I- S_8 -SP11 を分離した。なお、この反応系に 100 倍量の非標識 S_8 -SP11 を添加した場合の結合量を非特異的結合量として、全体の結合量から差引くことで特異的結合量を算出した。その結果、¹²⁵I- S_8 -SP11 は S_8 系統由来の柱頭マクロソーム膜画分に特異的に結合することが明かとなった (図 3-2 A)。この結合の親和性を求めるためにスクチャード解析を行ったところ、 S_8 系統の柱頭マクロソーム膜画分には ¹²⁵I- S_8 -SP11 に対して高親和性 ($K_d = 0.7$ nM, $B_{max} = 180$ fmol) と低親和性 ($K_d = 250$ nM, $B_{max} = 3$ pmol) の 2 つの結合部位が存在することが示唆された (図 3-2 B)。両結合部位は、どちらも S_8 系統のマクロソーム膜画分に特異的に存在することから、いずれも S 遺伝子座にコードされる分子 (SRK あるいは SLG) によって構成されていることが期待された。

化学架橋法による SP11 結合蛋白質の解析

SP11 の結合部位を構成する蛋白質を同定するため、柱頭マクロソーム膜画分に 10 nM の ¹²⁵I- S_8 -SP11 を加え、結合させた後、化学架橋剤である BS³ を添加し蛋白質間の架橋を行った。架橋後の膜画分を SDS-PAGE に供したところ、 S_8 系統の膜画分にのみ ¹²⁵I- S_8 -SP11 と架橋された M_r 120 K と 65 K のバンドが検出された (図 3-3)。両バンドは、過剰量 (100 倍量) の非標識 S_8 -SP11 の共存下では検出されないことから、 S_8 -SP11 との特異的な結合により標識された分子であることが示唆された。更に、架橋前に添加する ¹²⁵I- S_8 -SP11 の濃度を 10 nM から 0.1 nM の低濃度域まで段階的に下げたところ、両バンドのシグナル強度が協調的に減少することが示され、両バンドに対応する 2 つの蛋白質は、共に S_8 -

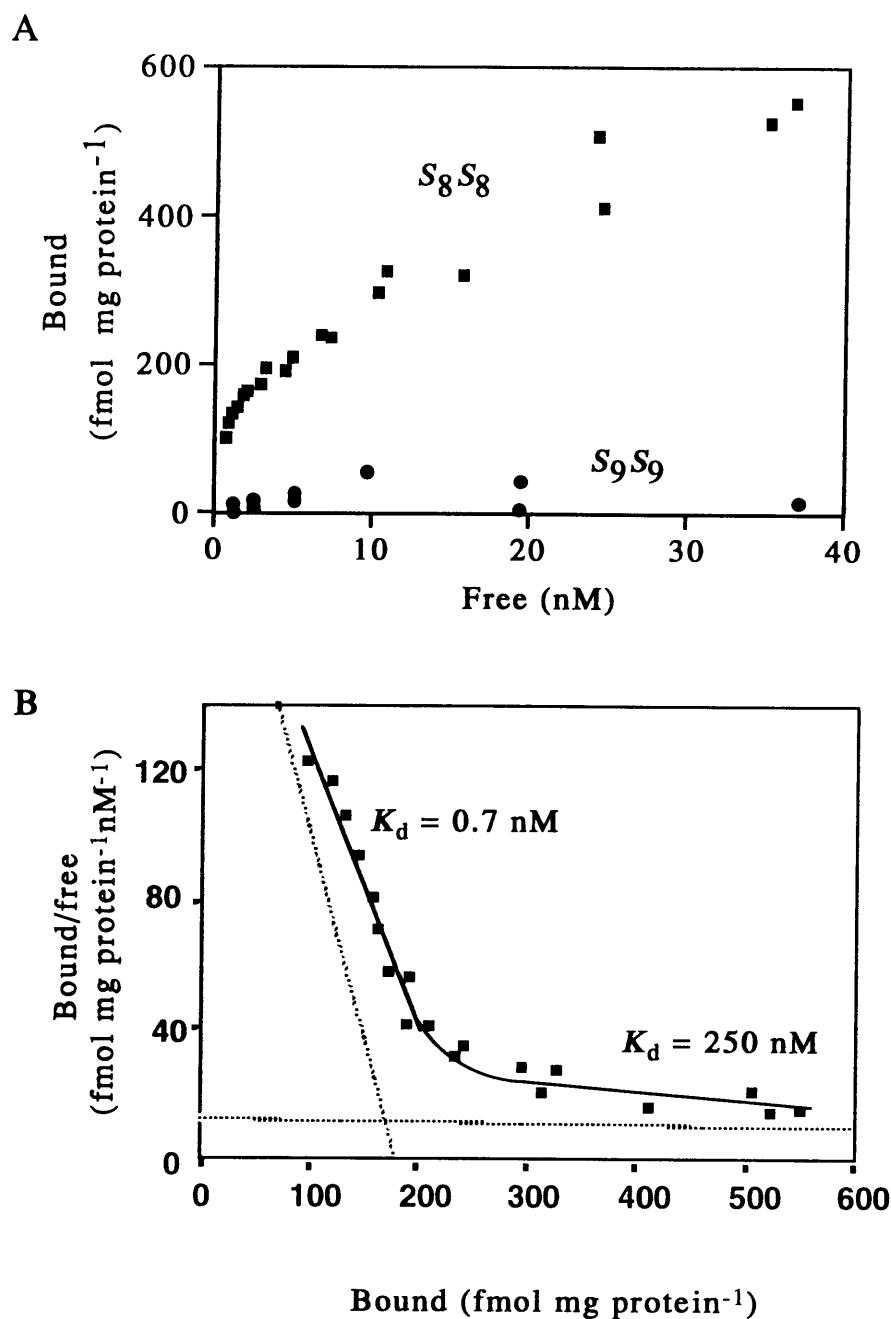


図 3 - 2 $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ の柱頭ミクロソーム膜画分への結合

(A) : S_8 及び S_9 系統由来の柱頭ミクロソーム膜画分に対する $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ の特異的結合量。特異的結合量は、 $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ のみを添加した時の結合量から100倍量の $S_8\text{-SP11}$ 存在下での結合量を差し引いて求めた。

(B) : $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ の S_8 柱頭ミクロソーム膜画分に対する特異的結合についてのScatchard解析結果。

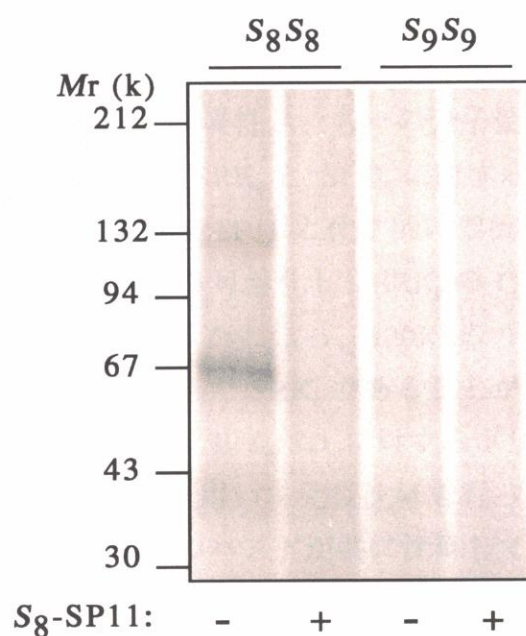


図 3 - 3 化学架橋剤を用いた¹²⁵I-S₈-SP11結合柱頭膜蛋白質の検出

¹²⁵I-S₈-SP11 (10 nM) を S₈-SP11 (1 μM) 存在下 (+)、非存在下 (-) で S₈ 及び S₉ 系統の柱頭ミクロソーム膜画分と結合反応させ、化学架橋剤 (BS³) を用いて架橋させた。その後、還元条件下で SDS-PAGE に供し ¹²⁵I-S₈-SP11 と架橋された蛋白質をオートラジオグラフィーにより検出した。

SP11 に対する一つの高親和性結合部位 ($K_d = 0.7 \text{ nM}$) の形成に関与している可能性が示唆された (図 3-4)。

免疫沈降法による SP11 結合蛋白質の同定

$^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ と結合し、化学架橋剤によって架橋された M_r 115K と 60K の蛋白質分子は、結合の S 遺伝子特異性と、各々の分子量から、 SRK_8 と SLG_8 であることが推定された。そこで、 SRK_8 と SLG_8 に対する抗体を用いて、これら分子の同定を試みた。まず、 $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ と化学的に架橋した後の S_8 系統の柱頭ミクロソーム膜画分を SDS により可溶化し、 SRK_8 の C 末端部位に対するペプチド抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、120K のバンドのみが回収され、このバンドが $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ に結合した SRK_8 であることが示唆された (図 3-5A)。続いて、同じ可溶化膜画分を $\text{SRK}_8\text{-SD}$ に対するポリクローナル抗体と SLG_8 に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、いずれの抗体を用いた場合においても 2 つのバンドが共に沈降してくることが示された (図 3-5A)。ただし、抗 SLG_8 モノクローナル抗体は、120K のバンドに比較して 65K のバンドをより選択的に沈降することが示された。 $\text{SRK}_8\text{-SD}$ と SLG_8 は 84% の相同性を示し、抗 $\text{SRK}_8\text{-SD}$ ポリクローナル抗体が SRK_8 および SLG_8 の両者を認識すること、抗 SLG_8 モノクローナル抗体も両者を認識するものの SLG_8 に対してより強い選択性を示すことを考慮すると (data not shown)、これらの免疫沈降結果は 65K のバンドが $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ と結合した SLG_8 であることを強く示唆するものであった。

次に、架橋後の膜画分を SDS の代わりに変性作用の弱い非イオン性の界面活性剤 (1% TritonX100) で可溶化させ、同様の免疫沈降を行った。その結果、抗 $\text{SRK}_8\text{-SD}$ ポリクローナル抗体を用いた場合と同様に、 SRK_8 の C 末端部位に対するペプチド抗体を用いた場合にも、120K (SRK_8) のバンドと共に 65K (SLG_8) のバンドが沈降してくることが示された (図 3-5B)。この結果は、少なくとも $S_8\text{-SP11}$ が結合した状態では、 SRK_8 と SLG_8 が複合体を形成していることを示唆するものであった。

ミクロソーム膜画分を用いた上記実験において、可溶性蛋白質である SLG が検出されたことから、膜画分に混入している SLG_8 と $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ が架橋された可能性が考えられた。しかし、ミクロソーム膜画分を徹底的に洗浄した後、上記架橋実験を繰り返しても 120K と 65K のバンドパターンに変化は

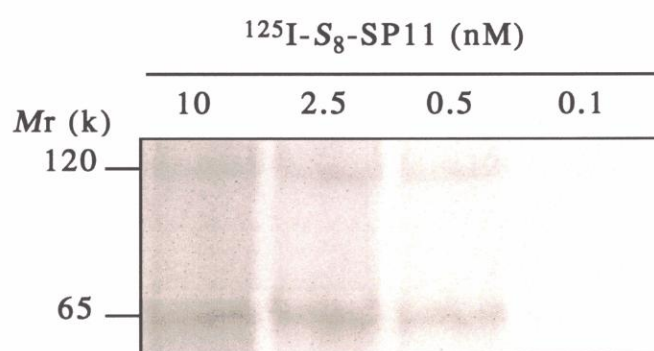


図 3 - 4 $S_8\text{-SP11}$ 高親和性結合サイトにおける $^{125}\text{I}\text{-S}_8\text{-SP11}$ の濃度効果

S_8 系統柱頭ミクロソーム画分に対して0.1 - 10 nMの $^{125}\text{I}\text{-S}_8\text{-SP11}$ を結合させた後、化学架橋剤により架橋された蛋白質を図 3 - 3 と同じ方法で解析した。

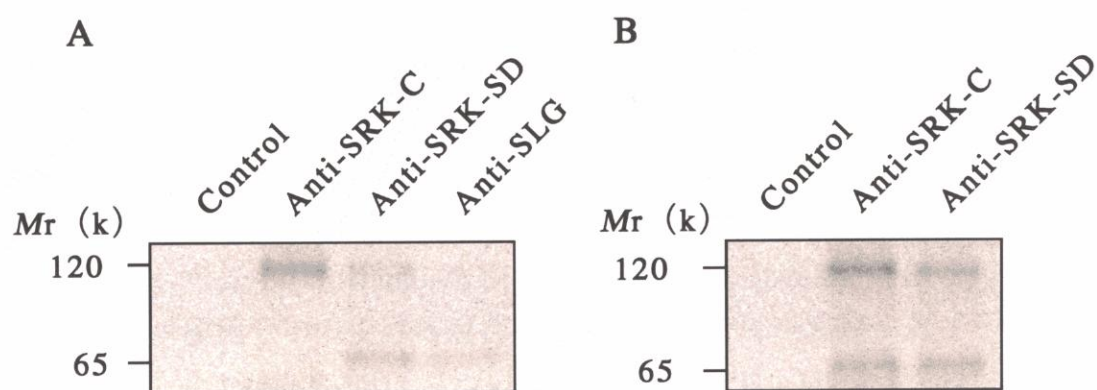


図 3 - 5 ^{125}I - S_8 -SP11結合蛋白質の免疫沈降解析

(A) : ^{125}I - S_8 -SP11と架橋されたS8系統由来、柱頭ミクロソーム膜蛋白質を1% SDSにより可溶化し、前血清のIgG画分 (Control) , SRK_8 のC末端部位に対するペプチド抗体 (Anti-SRK-C) , 抗 SRK_8 -SDポリクローナル抗体 (Anti-SRK-SD) , 抗 SLG_8 モノクローナル抗体 (Anti-SLG) で免疫沈降し、SDS-PAGEにより分離後、オートラジオグラフィーにより検出した。

(B) : Aと同じ実験を1% Triton X-100を可溶化剤として用いて行った。

認められなかった (data not shown)。また、逆に ^{125}I - S_8 -SP11 とミクロソーム膜画分との架橋時に、大量の可溶性 SLG_8 を添加しておいても、これらのバンドパターンが変化しないことが示された (図 3-6)。これらの結果は、SP11 が可溶性の SLG とは相互作用しないという BIAcore で得られた解析結果を再確認すると共に、本架橋実験で検出された SLG が、SRK と予め複合体を形成するなど、何らかの形で膜に局在する膜結合型の SLG であることを示唆した。

柱頭ミクロソーム膜画分中の SP11 受容体複合体の単離と解析

SP11 に対する受容体複合体の構造をより詳細に解析するため、ビオチンを N 末端に付加した S_8 -SP11 (biotin- S_8 -SP11) を化学的に合成し、それを用いて柱頭ミクロソーム膜画分中の受容体複合体をアフィニティー精製することを試みた。なお、使用した biotin- S_8 -SP11 については、 ^{125}I - S_8 -SP11 の柱頭ミクロソーム膜画分への結合を競合阻害すること、すなわち S_8 -SP11 同様に受容体複合体への結合活性を保持していることを確認した (data not shown)。まず、 S_8 および S_9 系統の柱頭の破碎物に biotin- S_8 -SP11 を添加し一定時間平衡化させた後、可溶性画分と膜画分に分離した。可溶性画分についてはそのまま、また膜画分については非イオン性の界面活性剤 (1% TritonX-100) で可溶化した後に、biotin- S_8 -SP11 と結合した分子を Streptavidin Sepharose により回収した。

回収された S_8 -SP11 結合性蛋白質を、抗 SLG_8 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析に供したところ、可溶性画分からは全くバンドは検出されなかった (図 3-7)。この結果は、柱頭可溶性画分に大量に含まれる可溶性 SLG_8 が S_8 -SP11 とは相互作用しないことを再度確認するものであった。

一方、膜画分からは、 S_8 系統特異的に M_r 105K と 60K の位置に SRK_8 と SLG_8 と推定されるバンドが検出され、このアフィニティー精製により受容体複合体が精製されてくることが示された。しかし、この方法により膜画分から回収された SLG_8 と推定される分子の分子量 (60K) は、可溶性の SLG_8 の分子量 (55K) より明らかに大きく、膜画分中の SLG_8 が何らかの翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。

動物培養細胞を用いた SP11 受容体の再構築の試み

柱頭のミクロソーム膜画分に含まれる受容体複合体の量はごく微量であり

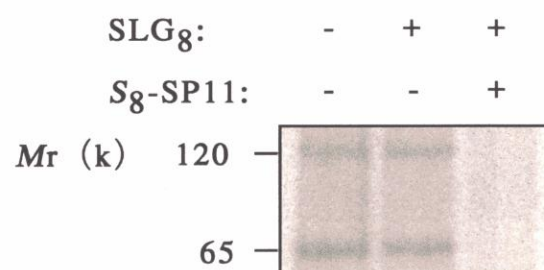


図 3 - 6 化学架橋実験における可溶性SLG₈添加の効果

¹²⁵I-S₈-SP11 (10 nM) と同時に、過剰量可溶性SLG₈ (100 nM) あるいは S₈-SP11 (1 μM) を S₈系統柱頭ミクロソーム膜画分に添加し、図 3 - 3 と同様の方法により架橋された蛋白質を検出した。

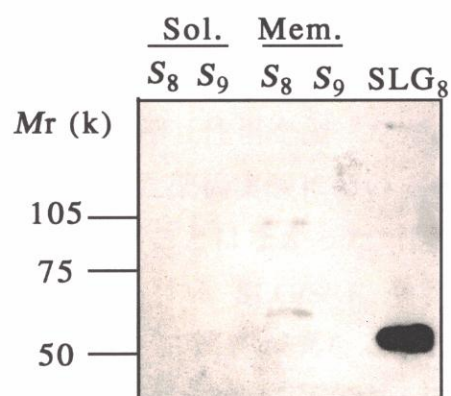


図 3 - 7 Biotin-S₈-SP11を用いたS₈-SP11受容体複合体の精製

S₈及びS₉系統の柱頭可溶性画分 (Sol.) とミクロソーム膜画分 (Mem.) 中のBiotin-S₈-SP11結合蛋白質をStreptavidin Sepharoseにより回収し、還元条件下でSDS-PAGEにより分離後、抗SLG₈モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。なお、柱頭より精製した可溶性SLG₈ (0.1 pmol) を同時に泳動した (右レーン)。

($B_{\max} = 180 \text{ fmol/mg protein}$)、上記精製法により得られる受容体複合体を用いてさらなる解析を進めることは困難であると予想された。そこで、SRK 及び SLG を動物細胞の COS-7 に一過性に発現させ、活性型の SP11 受容体複合体が再構築されるかどうかを試してみた。まず、(SV40 の ori を有する) 発現ベクターに SRK_g あるいは SLG_g を組み込んだものを作製し、COS-7 に導入した。細胞ミクロソーム膜画分のウェスタンブロット解析により、 SRK_g を導入した細胞では SRK_g の発現が、 SRK_g と SLG_g を同時に導入した細胞では両者の共発現が蛋白質レベルで確認された (図 3-8)。しかし、これらの細胞のミクロソーム膜画分を使って $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ との相互作用を調べたが、いずれの膜画分も結合活性を示さず (data not shown)、また架橋実験においても発現した SRK_g あるいは SLG_g と $^{125}\text{I-S}_8\text{-SP11}$ が架橋されることはなかった (図 3-9)。この結果は、柱頭のミクロソーム膜画分中に存在する SLG/SRK 受容体複合体の構造と、COS-7 細胞膜上に発現した SLG/SRK の構造が異なることを示唆しており、活性型の受容体複合体の再構成には、乳頭細胞に存在する未知の因子の必要性や、あるいは動物細胞とは異なる植物細胞固有の翻訳後修飾の必要性が強く示唆された。

SP11 による SRK 活性化の解析

これまでに花粉表層に存在する SP11 が柱頭のミクロソーム膜画分中の SLG/SRK 複合体と S 遺伝子特異的に強く結合することを見出してきたが、この結合は、SRK のキナーゼを活性化することで、乳頭細胞内に不和合性シグナルを伝達しているものと予想された。この点を実験的に証明するために、 S_8 系統の柱頭ミクロソーム膜画分から細胞膜画分を精製し、SP11 を添加することによって SRK_g の自己リン酸化活性が上昇するかどうかを検討した。その結果、10 nM の $S_8\text{-SP11}$ を添加すると SRK_g の自己リン酸化レベルが有意に上昇することが示された (図 3-10)。この SRK_g の自己リン酸化レベルの上昇は、 $S_9\text{-SP11}$ の添加によっては認められなかったことから、同じ S 遺伝子型の SP11 による S 遺伝子特異的な活性化であることが示された。

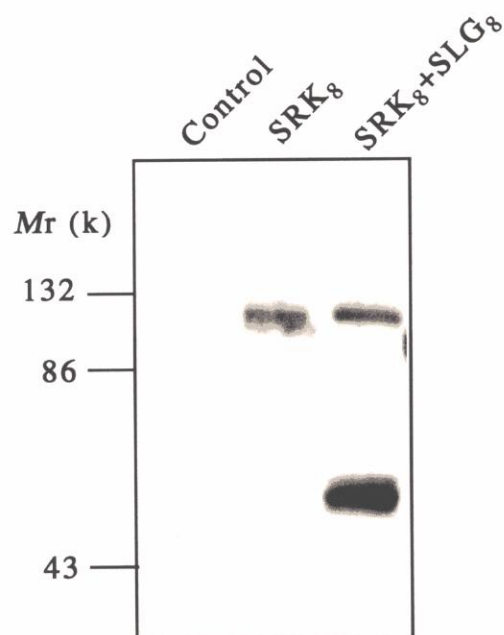


図 3 - 8 COS-7細胞におけるSRK₈及びSLG₈の発現

SRK₈及びSLG₈を一過的に発現させたCOS-7細胞のミクロソーム膜画分 (10 μ g) を還元条件下でSDS-PAGEにより分離後、抗SLG₈モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析に供した。Controlは、形質転換を行っていないCOS-7細胞のミクロソーム膜画分。

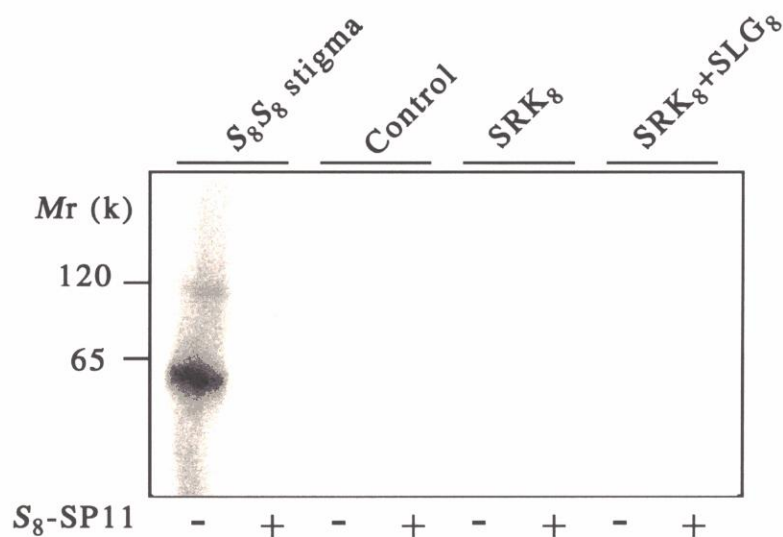


図 3 - 9 COS-7細胞発現SRK₈/SLG₈の¹²⁵I-S₈-SP11結合活性

SRK₈及びSRK₈とSLG₈とを共発現させたCOS-7細胞のミクロソーム膜画分（図 3 - 8 参照）に、¹²⁵I-S₈-SP11（10 nM）を添加し、S₈-SP11（1 μM）存在下（+）又は非存在下（-）で結合反応を行い、BS³により化学架橋後、図 3 - 3 と同じ方法で架橋された蛋白質を検出した。S₈系統の柱頭ミクロソーム膜画分をポジティブコントロールとして用いた（左側2レーン）。

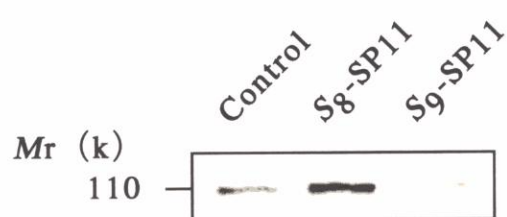


図 3 - 1 0 SP11刺激によるSRK₈の自己リン酸化解析

S₈系統の柱頭細胞膜画分に10 nM のS₈-SP11またはS₉-SP11を反応させた後、SRK₈を免疫沈降により回収し、[γ -³²P] ATPを添加して自己リン酸化反応を行った。リン酸化SRK₈は、SDS-PAGEにより分離後、オートラジオグラフィーにより検出した。

3-4 考察

本章においては、第2章で作製した活性型の SP11 を用いて、SP11 の受容体に関する様々な生化学的解析を展開した。まず、BIAcore を用いた解析により、SP11 が柱頭可溶性画分から精製した SLG、あるいはカイコで発現させた SRK-SD とは相互作用しないことを示した。一方、放射能標識した SP11 を用いた結合実験により、柱頭ミクロソーム膜画分中に *S* 遺伝子特異的な結合活性を示す高親和性と低親和性の2種類の SP11 受容体が存在することを明らかにした。そして、架橋実験と免疫沈降実験により、高親和性の SP11 受容体の結合中心がミクロソーム膜画分中の SRK と SLG により構成されていることを明らかにした。また、biotin 標識した SP11 を用いて柱頭ミクロソーム膜画分中の SP11 受容複合体をアフィニティー精製し、その中に SRK と SLG が含まれることを再確認すると共に、受容体複合体を構成する SLG が可溶性 SLG より分子量が大きいことから、何らかの翻訳後修飾を受けている可能性を指摘した。さらに、SP11 を柱頭細胞膜画分に添加すると SRK の自己リン酸化が誘導されることを示し、SP11 が単独で SRK のキナーゼ部位を活性化することを明らかにした。

以上の結果は、花粉表層に存在する SP11 が単独で花粉の *S* 表現型を決定するリガンド分子として機能し、乳頭細胞膜上に存在する同じ *S* 遺伝子型の SLG/SRK 受容体複合体と結合して SRK の自己リン酸化を誘導することで、乳頭細胞内に不和合性反応を誘起していることを強く示唆するものであった。しかし、この SP11 の SLG/SRK による受容機構については、まだ不明確な点が複数残されている。以下にそれらの点を指摘し、考察する。

筆者は、特定の S-S 結合を持ち、生物活性を有する SP11 を結合実験に用いることで、柱頭ミクロソーム膜画分に高親和性と低親和性の2種類の SP11 受容体の存在を明らかにすることが出来た。このうちの前者の結合活性はかなり強力であり ($K_d = 0.7$ nM)、最近解離定数が測定された唯一の植物受容体型キナーゼである BRI1 の brassinolide に対する結合活性 ($K_d = 7.4 \sim 10.8$ nM) 以上のものであった (Wang et al., 2001)。一方の低親和性の受容体については、これも *S* 遺伝子特異性を示すことから、*S* 遺伝子座にコードされる SRK あるいは SLG を構成成分とすることが期待されるが、本研究では研究の焦点を高親和性受容体に絞ったために、さらなる解析は行っていない。今後、高濃度 SP11 存在下

での架橋実験や、精製した柱頭細胞膜画分を用いての結合実験などを行う必要がある。

ところで、高親和性受容体の構成成分中に SRK と SLG の両者が含まれることを、筆者は架橋実験とそれに続く免疫沈降実験により明らかにした。用いた化学的架橋法は、これまでに動物細胞等における受容体構成蛋白質の解析に広く用いられ、IL-2 受容体複合体や TGF- β 受容体複合体の解明に貢献してきた手法である (Cox et al., 1990; Yamashita et al., 1994)。本研究で使用した化学架橋剤 BS³ は、11 Å 以内に存在するアミノ基間を架橋することから、得られた架橋実験の結果は、膜に結合した ¹²⁵I-S₈-SP11 が、SRK₈ および SLG₈ のごく近傍に存在していること、すなわち SRK₈ と SLG₈ が S₈-SP11 に対する結合部位を形成していることを明確に示すものであった。

さて、形質転換実験により SRK₂₈ と共に SLG₂₈ を導入した植物体の雌ずいが、SRK₂₈ を単独で導入した植物体の雌ずいよりも S₂₈ 表現型の花粉に対してより強い不和合性を示すことが報告されて以来 (Takasaki et al., 2000)、SLG の不和合性反応に対する“補強効果”の分子機構に関しては様々な議論が成されてきた (Dickinson, 2000)。受粉時に花粉表層より放出された SP11 は、乳頭細胞壁中に大量に存在する可溶性の SLG とまず会おうものと予測される。そこで、SLG が SP11 を細胞膜上の SRK まで運搬するいわゆる“shuttle”として機能している可能性や、あるいは SLG が SP11 を捕捉した後に SRK と複合体を形成し、SRK を活性化するいわゆる可溶性の“co-receptor”として機能している可能性が指摘されてきた (Goring, 2000)。しかし、本研究においては可溶性の SLG と SP11 の間には全く相互作用が認められておらず、これらの可能性は低いものと考えられる。

一方、Dixit らは SLG の転写量が減少している *B. rapa* 変異体 (*scf1*) において、SRK の転写レベルは正常にも拘わらず、抗体を用いたウエスタンブロット解析からは蛋白質レベルでの存在が確認できないことを報告した (Dixit et al., 2000)。また、彼らは SRK および SLG を導入したタバコの形質転換体の解析から、SLG を共発現させないと SRK が高分子量の凝集体を形成することを見出し、SLG が SRK の構造の安定化に寄与している可能性を指摘してた (Dixit et al., 2000)。この安定化の分子機構については全く解析が成されていないが、本研

究により示された様に SLG が SRK と受容体複合体を形成しているとすれば、この受容体複合体の形成こそが SRK を安定化させる要因であると考えられることも出来よう。実際、ロイシンリッチリピート (LRR) 型の細胞外領域を有する植物の膜受容体型キナーゼ CLAVATA1 (CLV1) は、LRR 領域と膜貫通領域のみから成る膜蛋白質 CLV2 と共に CLV3 に対する受容体複合体を構成していることが示唆されているが (Trotochaud et al., 2000)、*clv2* 変異体では CLV1 が高分子量の凝集体を形成してしまい、*clv1* 変異体と類似した表現型が現れることが報告されている (Kayes and Clark, 1998; Jeong et al., 1999)。

SLG が SRK の安定化に寄与しているとするということは、SRK と SLG は SP11 が結合する前から複合体を形成していることになる。実際、Giranton らは柱頭のコクソーム膜画分を 1% TritonX-100 により可溶化した後に、glutaraldehyde により架橋し、ウエスタンブロット解析に供することで、SRK の homo-dimer および SRK/SLG あるいは SRK/eSRK と推定される hetero-dimer が柱頭膜に予め存在することを指摘している (Giranton et al., 2000)。筆者は、 ^{125}I - S_8 -SP11 を添加して架橋した膜画分を非イオン性の界面活性剤 (1% TritonX-100) で可溶化し、 SRK_8 の C 末端部分に対するペプチド抗体で免疫沈降すると SLG_8 も共沈してくることから、 S_8 -SP11 結合後の SRK および SLG が複合体を形成している可能性を指摘してきた。しかし、SP11 結合前から複合体を形成しているかどうかについては、まだ明確な実験的証拠は得られておらず、今後さらに追求していく必要がある。

さて、筆者の実験結果は SLG が SP11 の受容に直接的に関与していることを強く示唆するものであったが、これまでに解析されてきた多数の *S* 複対立遺伝子の中には、SLG を持たないものも小数ながら見出されてきている (Okazaki et al., 1999; Suzuki et al., 2000)。さらに、先に示した形質転換実験では、 SRK_{28} 遺伝子を導入しただけで、雌ずい側に S_{28} 表現型を付与できることが示されている (Takasaki et al., 2000)。こうした植物体では、SRK が単独で受容体として機能している可能性や、あるいは、eSRK や SLR1, 2, 3 などの SLG 様因子が SLG の機能を代替しているので可能性が考えられる。今後は、こうした SLG を持たない *S* 系統や SRK のみを導入した形質転換体について解析していくことも SP11 の受容機構を解明する上で重要であると思われる。

SP11 の受容機構をさらに解明するために、筆者は動物細胞の COS-7 を用い

て活性型の受容体複合体を再構成することを試みた。SRK₈を単独で、あるいはSLG₈と共に共発現させたCOS-7を調製することには成功したが、これらの細胞のミクロソーム膜画分は期待に反して¹²⁵I-S₈-SP11と全く結合活性を示さなかった。アブラナ科植物の乳頭細胞にSRKおよびSLGを発現させれば、機能的な受容体が再構成され、新たなS遺伝子形質が付与されることから、乳頭細胞と動物細胞とではSRKおよびSLGの翻訳後修飾に何らかの差がある可能性が強く示唆された。この意味においてbiotin-S₈-SP11を用いてアフィニティー精製された活性型受容体複合体のSLGの分子量(60K)が可溶性SLGの分子量(55K)より大きいことが判明した点は大変興味深い。例えば、ペプチド性のエリシター蛋白質であるクリプトゲインは、タバコの細胞膜画分に存在する分子量162Kと50Kの2分子に結合するが、N-glycosidase処理を行った膜画分には結合しないことから、糖鎖による受容体の翻訳後修飾が、リガンドとの結合に必須であることが指摘されている(Bourque et al., 1999)。今後、両SLGの差異を解析していくことは極めて重要であろう。また、SP11に対する活性型の受容体複合体の再構成には、乳頭細胞中に存在する未知の第3あるいは第4の因子が必須である可能性も考えられる。筆者が開発したbiotin-S₈-SP11を用いたSP11の受容体複合体のアフィニティー精製法は、SLG₈やSRK₈の翻訳後修飾の違いを明らかにしていく上で、また活性型受容体に含まれる未知の構成成分を同定していく上で、有効な手段になるものと期待される。

最近、筆者がこれまでに述べてきた実験結果と矛盾する結果が、他の研究グループより報告されてきている。

Kachrooらは、タバコで発現させたeSRK₆の融合蛋白質(eSRK₆-FLAG)とSCR/SP11にmyc-tagを付与した大腸菌発現蛋白質(SCR₆-myc-His₆およびSCR₁₃-myc-His₆)との相互作用を生化学的に解析した。すなわち、マイクロタイタープレート上にeSRK₆-FLAGをコートし、次いでSCR-myc-His₆溶液を反応させ、プレート上のeSRK₆-FLAGに捕捉されたSCR-myc-His₆を抗myc抗体を一次抗体とする一種のELISA法により定量した。その結果、SCR₆-myc-His₆の方がSCR₁₃-myc-His₆より約10倍強い結合を示したとし、SCR/SP11がS遺伝子特異的にeSRKと結合すると結論している(Kachroo et al., 2001)。しかし、用いたSCRとeSRKはいずれも発現させた融合蛋白質を、付与したtagを利用してアフィニティー精製しただけのものであり、酸化条件下での巻き戻し操作

などを行っていないので、どの程度活性型の分子種が含まれるかは疑問である。また、マイクロプレート上で μg オーダーの蛋白質を反応させて約 10 倍“量”の SCR-myc-His₆ が捕捉されたことを根拠に、S 特異的な結合が観測できたとしているが、SCR-eSRK 間の特異的な結合を測定していることの証明が無い上に、果たして速度論的解析に不向きな本法を用いて、どの程度結合の“強度”が議論できるのかは大いに疑問が残る。eSRK が SP11 と相互作用しうるのかどうかについては、より厳密な結合解析が必要であると思われる。

これとは別に Bower らは、酵母の Two-hybrid 法を用い SRK のキナーゼ領域と相互作用する蛋白質として thioredoxin 様蛋白質 THL1, 2 を見出し、これらが実際 thioredoxin 活性を有することを明らかにした (Bower et al., 1996)。一方、Cabrillac らは、柱頭や SRK を発現させた昆虫細胞から調製したミクロソーム膜画分中の SRK が強力な自己リン酸化活性を有することを示し、これに柱頭の可溶性蛋白質を添加すると SRK が不活性化されること、この不活性化は THL1 発現蛋白質の添加によっても認められたことから、SRK 不活性化因子の本体が可溶性蛋白質中の THL1 であることを報告した (Cabrillac et al., 2001)。彼らは、当初 SRK を発現させた昆虫細胞のミクロソーム膜画分に、SP11 が含まれる花粉表層蛋白質を添加しても SRK の自己リン酸化の上昇が認められなかったことを報告していたが (Giranton et al., 2000)、この膜画分に柱頭の可溶性蛋白質を添加しておいてから、SRK と同じ S 遺伝子型の花粉表層蛋白質を添加することで SRK の活性化が検出できることを示した (Cabrillac et al., 2001)。そこで彼らは、柱頭細胞膜上の SRK は、thioredoxin 様物質 (THL1, 2) によって不活性化状態に保持されており、花粉側 S 因子の刺激によりこの抑制が解除され、SRK が活性化されるという仮説を提唱した (Cabrillac et al., 2001)。

筆者も上記仮説を検証するべく、Cabrillac らと同様に調製した柱頭ミクロソーム膜画分を使って、柱頭可溶性蛋白質や thioredoxin の効果を測定したが、SRK の自己リン酸化活性に対する抑制効果は検出されず、実験を再現することはできなかった (data not shown)。また、この系に SP11 を添加すると柱頭可溶性蛋白質や thioredoxin の有無にかかわらず、SRK の自己リン酸化レベルが S 遺伝子特異的に上昇することが示された (data not shown)。そこで、筆者が調製した柱頭ミクロソーム膜画分に可溶性の thioredoxin が残存している可能性を考え、本章に示す様にミクロソーム膜画分を精製し、細胞膜画分を使って同じ実験を

繰り返したが、結果は同様であり、thioredoxin の添加なしに SP11 の添加によって SRK の自己リン酸化レベルが上昇することが示された（第3章7項参照）。従って、実験結果が相反する理由は不明であるが、筆者は thioredoxin による SRK の抑制が乳頭細胞内で起きていたとしても、この不活性化と SP11 による SRK の活性化は独立した反応だと考えている。また、彼らの仮説の根拠となっている実験系は、昆虫のミクロソーム膜画分に加え、柱頭の可溶性蛋白質と花粉表層蛋白質が含まれる混合系であるため、昆虫細胞に発現させた SRK が本当に SP11 に対する活性型受容体を再構成しているのかという点についても、慎重に判断する必要があると考えている。

これまで述べてきたように、SP11 の受容機構や SRK の活性化機構、さらには SLG の自他認識反応における役割といった点については、まだ細部では不明確な点が多く残されており、各研究者の見解も完全には一致していない。今後さらに詳細に検討を加えていく必要があると考えているが、本研究で得られた実験結果をもとに、現時点で筆者が推定している自他識別反応の分子機構モデルを以下に紹介する（図3-11）

アブラナ科植物の自家不和合性の自他識別反応を制御する *S* 遺伝子座は、*B. rapa* では 20~40 kbp の大きさであり、その中に柱頭の乳頭細胞で特異的に発現する SRK および SLG、ならびに花粉および葯のタペート細胞で発現する SP11 の3つがコードされている。いずれの分子も *S* 遺伝子間で高度な多型を示す。花粉およびタペート細胞より分泌された SP11 は花粉の成熟に伴い花粉表層へと移行し、花粉の *S* 表現型を提示するリガンド分子として機能する。受粉時に花粉表層より放出された SP11 は乳頭細胞の細胞壁を拡散して行き乳頭細胞膜上の SRK と SLG とから成る受容体複合体によって受容される。この SP11 と SRK/SLG 間のいわゆるリガンド-受容体間の相互作用が SRK を活性化し、その自己リン酸化を誘導する。この情報がリン酸化シグナルの形で乳頭細胞内へ伝えられ、花粉への水の供給阻害、花粉管の乳頭細胞壁内への侵入阻害といった不和合反応が誘起される。なお、このリガンド-受容体間の結合・活性化は *S* 遺伝子特異的であり、これがアブラナ科植物における自他識別反応の基本となっている。

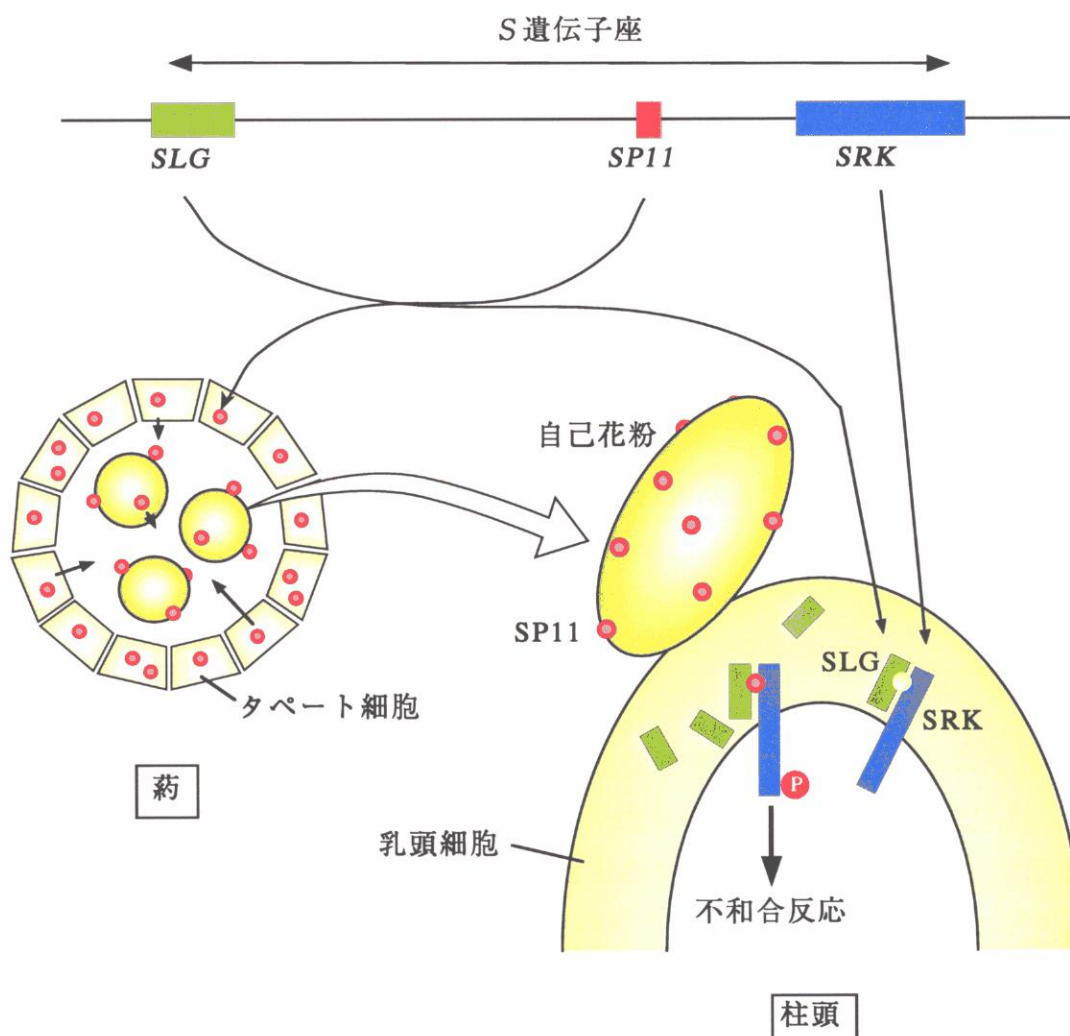


図 3 - 1 1 アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別のモデル図

アブラナ科植物の自家不和合性の自他識別反応を制御するS遺伝子座には、柱頭の乳頭細胞で発現するSRK (S-receptor kinase) およびSLG (S-locus glycoprotein)、ならびに葯のタペート細胞で発現するSP11 (S-locus protein 11) がコードされている。いずれの分子もS遺伝子間で多型を示す。葯のタペート細胞より分泌されたSP11は花粉表層へと移行し、花粉のS表現型を決定する因子 (花粉側S因子) として機能する。自家受粉時、SP11はSRKとSLGを含む受容体複合体に結合し、SRKを活性化することで乳頭細胞に不和合性反応を誘起している。このリガンド-受容体複合体間の結合と活性化はS遺伝子特異的であり、それが花粉の自他識別の基本となっている。

総括

アブラナ科植物の自家不和合性は、*S* 遺伝子座の複対立遺伝子によって制御されており、花粉と柱頭間で *S* 遺伝子の表現型が一致する場合に不和合性反応が誘起される。従って、不和合性における花粉の自他識別は、*S* 遺伝子座上にコードされる花粉側と柱頭側の *S* 遺伝子産物の相互作用を介して行われているものと推測される。しかし、これまでに自家不和合性を支配する柱頭側 *S* 因子として **SRK** が見出されていたが、花粉側 *S* 因子の実体は明らかにされておらず、その分子機構については推定の域を脱していなかった。また、**SRK** と同じく *S* 遺伝子座上にコードされ乳頭細胞で発現している **SLG** は、形質転換体の解析から不和合性反応を補強していることが示されたが、その補強効果の実体については何も明らかにされていなかった。

本研究では、**FDD** 法を系統間における遺伝子多型の検出に用いることで、*S* 系統間で多型を示す葯発現遺伝子 **SP11** を見出すことに成功した。**SP11** は、**SLG** と相互作用する花粉表層蛋白質として見出された **PCP-A1** と類似した新規の **PCP** 類をコードしており、*S* 遺伝子間で極めて多型に富んでいることが判明した。また、**SP11** のゲノムマッピングを行い、*S* 遺伝子座上 **SRK** 及び **SLG** の間に位置していることを明らかにした。さらに、**SP11** が花粉側 *S* 因子の本体であることを、**SP11** の発現蛋白質を乳頭細胞に処理すると和合花粉の吸水が *S* 遺伝子特異的に阻害されることを示すことにより証明した。

SP11 は、胞子体である葯のタペート組織と配偶体である花粉の両方において発現していること、成熟花粉においては **SP11** 蛋白質が花粉表層物質 (pollen coat) 中に局在していることを明らかにした。花粉より精製された **SP11** は、予想された位置でシグナルペプチドが除去された後、8 つのシステイン残基が全て分子内でジスルフィド結合を形成した酸化型の単量体であった。そこで、化学合成あるいは大腸菌による発現系を用いて **SP11** を作製し、徐々に酸化させることで酸化型の **SP11** を調製した。得られた酸化型 **SP11** の内、安定かつ特定の S-S 結合を有するもののみが花粉側 *S* 因子としての生物活性を示すことを、新たに開発したバイオアッセイ系を用いて証明した。**SP11** は、同じ *S* 遺伝子型の柱頭のミクロソーム膜画分に特異的に結合することが明かとなった。また、高親和性 ($K_d = 0.7 \text{ nM}$) および低親和性 ($K_d = 250 \text{ nM}$) の2種類の受容体の存

在が示唆された。このうち高親和性受容体については、架橋実験と免疫沈降実験により、SRK と SLG の両者を構成成分として含むことを明らかにした。また、biotin 標識した SP11 を使って受容体複合体を精製する系を確立すると共に、高親和性受容体に含まれる SLG が可溶性 SLG より分子量が大きく、構造的に異なる可能性を指摘した。さらに、*in vitro* リン酸化実験において、SP11 が単独で柱頭細胞膜上の SRK の自己リン酸化を *S* 遺伝子特異的に誘導することを明らかにした。

本論文で示してきた以上の実験結果は、アブラナ科植物の自家不和合性が、*S* 遺伝子座上にコードされる花粉表層蛋白質 SP11 と乳頭細胞膜上の SRK/SLG 複合体との間のいわゆるリガンド-受容体間相互作用によって引き起こされていること、また、この相互作用が同一の *S* 遺伝子産物間で特異的に起こることが自他識別の基本となっていることを明確に示すものであった。

本研究により、自家不和合性反応における最初の自己花粉の識別部分については、分子機構がかなり明らかとなった。しかし、自己花粉表層の SP11 により誘導された SRK の自己リン酸化情報が、どの様に乳頭細胞内に伝達され、最終的に花粉への水の供給阻害や花粉管の乳頭細胞壁への侵入阻害といった不和合性反応が引き起こされるのかについては、まだ殆ど解明されていない。自家不和合性の情報伝達系において SRK の直ぐ下流に位置する分子の候補として、ARC1 (arm repeat containing 1) が SRK のキナーゼ領域との相互作用を指標に yeast two-hybrid 法により見出されてきている (Gu et al., 1998)。ARC1 は、 β -カテニン様の arm repeat と酵母ユビキチン化因子 UFD2 に存在する U-box (Azevedo et al., 2001) を持つ推定分子量約 70K の蛋白質で、リン酸化された SRK と特異的に結合し、SRK によりリン酸化されることが示されている。また、ARC1 をアンチセンス方向に導入した形質転換植物が、部分的ではあるが自家不和合性が打破され少数の自殖種子を付ける様に変化したことから、ARC1 は不和合性の情報伝達に関与していると考えられているが、具体的な機能については未解明である。また上記実験で完全には自家不和合性が打破されなかったことから、SRK 下流には ARC1 以外の分岐したシグナル伝達系の存在も示唆されている (Stone et al., 1999)。

また、自家和合性変異株、*B. rapa* var *yellow sarson* の和合性の原因解析から、劣性の原因遺伝子 *mod* の存在が指摘され、また MOD が SRK の下流の情報伝

達に参与していることが示唆されてきた (Hinata and Okazaki, 1986)。Ikeda らは、*mod* のポジショナルクローニングを進め、本遺伝子が水チャンネル分子の aquaporin 様遺伝子をコードしていると報告したが (Ikeda et al., 1997)、その後この同定は否定されている (Fukai et al., 2001)。今後、これらの因子の実体・機能解明は、自家不和合性の分子機構解明に大きく貢献するであろう。また、本研究により花粉側 *S* 因子 SP11 が同定されたことで、情報の最初の入力部分を明確にした上で、下流の情報伝達系を解析することが始めて可能となった。自家不和合性における情報伝達系の解明が一気に加速されるものと期待している。

A. thaliana の全ゲノム配列解析が完了し、本植物のゲノム上には少なくとも 340 の受容体型キナーゼがコードされている (The Arabidopsis Genome Initiative) ことが明かとなった。さらに、変異体の解析を中心に、これら受容体型キナーゼが、植物細胞の増殖、分化、器官形成、生殖、病原菌の認識、植物ホルモンの受容、細胞死といった極めて広範な生命現象に参与し、それぞれの細胞の運命を決定する細胞外センサーとして機能していることが次第に明らかにされてきた (Shiu and Bleecker, 2001)。これら受容体型キナーゼを介した情報伝達系を解明し、その経路を人為的に制御することは植物の分子育種上極めて重要と考えられる。しかし、これだけ多くの受容体型キナーゼ分子が見出されてきているにもかかわらず、リガンド分子が同定され、その直接的結合や活性化が報告された例は、本論文中で紹介した CLV1, BRI1, FLS2 などの数例に過ぎない (Trotochaud et al., 2000; Wang et al., 2001; Gomez-Gomez et al., 2001)。本研究が、自家不和合性の分子機構の解明に止まらず、植物における受容体型キナーゼを介した情報伝達系の解明に広く貢献するものと期待している。

謝辞

本研究を行うに当たり、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座教授 磯貝彰先生には、卓越した研究環境だけでなく、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました。心より感謝致します。本研究を進めるに当たり、また本論文の作成に關してましても、終始適切懇切丁寧なご指導と的確なご助言を賜りました同助教授 高山誠司先生に深く感謝致します。また、同助手 柴博史先生、同教務職員 岩野恵先生、同研究員 円谷徹之博士には、常日頃からご助言、ご教示を賜りました。心より感謝致します。同助手 蔡晃植先生、学術振興会研究員 中島芳浩博士（現）には、常日頃よりご援助及び、数々のご助言を賜りました。深く感謝の意を表します。

研究を進めていく上で、数々の貴重なご助言を頂きました東北大学名誉教授 日向康吉先生（現 採取実用技術研究所）、岩手大学助教授 渡辺正夫先生に心より感謝致します。

理化学研究所主任研究員 松本正吾博士、同研究員 岡野（黄）琳恵博士（現、東京大学農学部研究員）、同職員 栗原政明氏には、カイコでの発現タンパク質作製に關して、材料提供とご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。本博士論文の審査をして頂き、またことある毎に貴重なご助言とご援助を賜りました奈良先端科学技術大学院大学教授 新名惇彦先生、同教授 横田明穂先生、同助教授 河内孝之先生に深く感謝致します。

SP11 の発現解析を行ってくれた上田俊一氏、SP11 の組織化学的解析及びバイオアッセイを行ってくれた船戸美幸氏、両修論学生に心より感謝の意を表します。

本実験において終始協力して頂いた奈良先端科学技術大学院大学職員 杉田英恵氏、実験材料である植物を育てて頂いた同職員 植田多鶴氏、実験材料を採取して頂いた 同職員 大西淑恵氏、湯浅和歌子氏、米山直子氏、また、様々な場面において援助して頂いた同職員 岩崎香奈子氏、佐藤寛子氏、山口美保氏に深く感謝致します。

最後になりましたが、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座に在籍されている方々、並びに過去に在籍されていた方々には大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 寒川賢治, 南野直人, 松尾寿之 (1991). 新生化学実験講座 9. ホルモン I ペプチドホルモン (東京化学同人), pp. 51-76.
- 浅野公介 (1999). アブラナ科植物の受粉・受精過程に関与する花粉表層蛋白質の解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M. J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* 6, 354-8.
- Bourque, S., Binet, M. N., Ponchet, M., Pugin, A., Lebrun-Garcia, A. (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 274, 34699-705.
- Bateman, A. J. (1955). Self-incompatibility systems in angiosperms. III. *Cruciferae*. *Heredity* 9, 52-68.
- Bower, M. S., Matias, D. D., Fernandes Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S. J., and Goring, D. R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* *S* locus receptor kinase. *Plant Cell* 8, 1641-1650.
- Boyes, D. C., and Nasrallah, J. B. (1995). An anther-specific gene encoded by an *S* locus haplotype of *Brassica* produces complementary and differentially regulated transcripts. *Plant Cell* 7, 1283-94.
- Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., Vrebalov, J., and Nasrallah, J. B. (1997). The self-incompatibility (*S*) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell* 9, 237-47.
- Boyes, D. C., Chen, C. H., Tantikanjana, T., Esch, J. J., and Nasrallah, J. B. (1991). Isolation of a second *S*-locus-related complementary DNA from *Brassica oleracea*; Genetic relationships between the *S* locus and two related loci. *Genetics*. 127, 221-228.

- Cabrillac, D., Cock, J. M., Dumas, C., and Gaude, T. (2001). The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410, 220-3.
- Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio-Chable, V., Giranton, J. L., Dumas, C., Gaude, T., and Cock, J. M. (1999). The *S*₁₅ self-incompatibility haplotype in *Brassica oleracea* includes three *S* gene family members expressed in stigmas. *Plant Cell* 11, 971-86.
- Chen, C.-H., and Nasrallah, J. B. (1990). A new class of *S* sequences defined by a pollen recessive self-incompatibility allele of *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* 222, 241-248.
- Cock, J. M., Stanchev, B., Delorme, V., Croy, R. R., and Dumas, C. (1995). *SLR3* : a modified receptor kinase gene that has been adapted to encode a putative secreted glycoprotein similar to the *S* locus glycoprotein. *Mol. Gen. Genet.* 248, 151-61.
- Conner, J. A., Conner, P., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1998). Comparative mapping of the *Brassica S* locus region and its homeolog in *Arabidopsis*. Implications for the evolution of mating systems in the *Brassicaceae*. *Plant Cell* 10, 801-12.
- Conner, J. A., Tantikanjana, T., Stein, J. C., Kandasamy, M. K., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1997). Transgene-induced silencing of *S*-locus genes and related genes in *Brassica*. *Plant J.* 11, 809-823.
- Cox, G. W., Mathieson, B. J., Giardina, S. L., and Varesio, L. (1990). Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages. *J. Immunol.* 145, 1719-26.
- Creighton, T. E. (1992). Up the kinetic pathway. *Nature* 356, 194-195.
- Cui, Y., Brugiere, N., Jackman, L., Bi, Y. M., and Rothstein, S. J. (1999). Structural and transcriptional comparative analysis of the *S* locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell* 11, 2217-31.
- Delorme, V., Giranton, J. -L., Hatzfeld, Y., Friry, A., Heizmann, P., Ariza, M. J., Dumas, C., Gaude, T., and Cock, J. M. (1995). Characterization of the *S* locus genes, *SLG* and *SRK*, of the

Brassica S₃ haplotype: identification of a membrane-localized protein encoded by the *S* locus receptor kinase gene. *Plant J.* 7, 429-440.

Dickinson, H. G. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8, 1-10.

Dickinson, H. G., Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (2000). Pollen stigma interactions: so near yet so far. *Trends Genet.* 16, 373-6.

Dixit, R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (2000). Post-transcriptional maturation of the *S* receptor kinase of *Brassica* correlates with co-expression of the *S*-Locus glycoprotein in the stigmas of two *Brassica* strains and in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 124, 297-312.

Doughty, J., Wong, Y. H., and Dickinson, H. G. (2000). Cystein-rich pollen coat proteins (PCP) and their interactions with stigmatic *S* (incompatibility) and *S*-related proteins in *Brassica*: Putative roles in SI and pollination. *Ann. Bot.* 85, 161-169.

Doughty, J., Henderson, F., McCubbin, A., and Dickinson, H. (1993). Interaction between a coating-borne peptide of the *Brassica* pollen grain and stigmatic *S* (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 467-471.

Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S. J., Willis, A. C., Parkin, I. A., and Dickinson, H. G. (1998). PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the *S* locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell* 10, 1333-47.

Elleman, D. (1996). Identification of pollen components regulating papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 133, 197-205.

Elleman, C. J., and Dickinson, H. G. (1988). Identification of pollen components regulating pollination-specific responses in the stigmatic papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 133, 197-205.

Elleman, C. J., and Dickinson, H. G. (1990). The role of the exine courting in pollen-stigma

interactions in *Brassica oleracea* L. New Phytol. 114, 511-518.

Elleman, C. J., and Dickinson, H. G. (1994). Non-host resistance, phytoalexins and the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. J. Exp. Bot. 45, 26-27.

Elleman, C. J., Franklin, T. V., and Dickinson, H. G. (1992). Pollination in species with dry stigmas: The nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. New Phytol. 121, 413-424.

船戸美幸 (2001). アブラナ科植物の自家不和合性における花粉側因子の組織化学的及び生理学的解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., and Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. J. Mol. Biol. 279, 257-70.

Frankel, R., and Goal, E. (1977). Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding. (Springer-Verlag), pp. 281.

Fryxell, P. A. (1957). Mode of reproduction of higher plants. Bot. Rev. 23, 135-233.

Fukai, E., Nishio, T., and Nasrallah, M. E. (2001). Molecular genetic analysis of the candidate gene for *MOD*, a locus required for self-incompatibility in *Brassica rapa*. Mol. Genet. Genomics 265, 519-25.

Giranton, J. L., Ariza, M. J., Dumas, C., Cock, J. M., and Gaude, T. (1995). The *S* locus receptor kinase gene encodes a soluble glycoprotein corresponding to the SRK extracellular domain in *Brassica oleracea*. Plant J. 8, 827-34.

Giranton, J. L., Dumas, C., Cock, J. M., and Gaude, T. (2000). The integral membrane *S*-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 3759-64.

Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., Boller, T., Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1155-63.

Goring, D. R. (2000). The search for components of the self-incompatibility signaling pathway(s) in *Brassica napus*. *Ann. Bot.* 85, 171-179.

Goring, D. R., and Rothstein, S. J. (1992). The *S*-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* 4, 1273-1281.

Goring, D. R., Glavin, T. L., Schafer, U., and Rothstein, S. J. (1993). An *S* receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *Plant Cell* 5, 531-9.

Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D. D., Goring, D. R., Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 382-7.

浜口道成 (1998). 改訂蛋白質実験法. (羊土社), pp. 111-113.

Hatakeyama, K., Takasaki, T., Watanabe, M., and Hinata, K. (1998). Molecular characterization of *S* locus genes, *SLG* and *SRK*, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. *Genetics* 149, 1587-97.

Heslop-Harrison, J. (1978). *Cellular Recognition Systems in Plants*. (London: Edward Arnold), pp. 1-

Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41, 1233-1258.

Hinata, K., and Nishio, T. (1978). *S*-allele specificity of stigma proteins in *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Heredity* 41, 93-100.

- Hinata, K., and Nishio, T. (1979). 自家不和合性の認識物質. 化学と生物 17, 691-696.
- Hinata, K., Okazaki, K., and Nishio, T. (1983). Gene analysis of self-incompatibility in *Brassica campestris* var. *yellow sarson* (a case of recessive epistatic modifier). Int. Rapeseed conf. 6, 354-357.
- Ikeda, S., Nasrallah, J. B., Dixit, R., Preiss, S., Nasrallah, M. E., Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1997). An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. Science 276, 1564-6.
- Isogai, A., Yamakawa, S., Shiozawa, H., Takayama, S., Tanaka, H., Kono, T., Watanabe, M., Hinata, K., and Suzuki, A. (1991). The cDNA sequence of *NSI* glycoprotein of *Brassica campestris* and its homology to *S*-locus-related glycoproteins of *B. oleracea*. Plant Mol. Biol. 17, 269-271.
- Isogai, A., Takayama, S., Shiozawa, H., Tsukamoto, C., Kanbara, T., Hinata, K., Okazaki, K and Suzuki, A. (1988). Existence of a common glycoprotein homologous to *S*-glycoproteins in two self-incompatible homozygotes of *Brassica campestris*. Plant Cell Physiol. 29, 1331-1336.
- Ito, T., and Kito, K. (1994). Fluorescent differential display; arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. FEBS Lett. 231-236.
- Ito, T. (1995). PCR 法の最新技術. (羊土社)
- Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. Plant Cell 11, 1925-34.
- Kachroo, A., Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (2001). Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. Science 293, 1824-6.
- Kandasamy, M. K., Paolillo, D. J., Faraday, C. D., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1989). The *S*-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma

- papillae. Dev. Biol. 134, 462-472.
- Kayes, J. M., and Clark, S. E. (1998). *CLAVATA2* a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. Development 125, 3843-51.
- 剣持昌之 (1999). アブラナ科植物の自家不和合性を支配する遺伝子座のゲノム解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Kishi-Nishizawa, N., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K., Yamakawa, S., Shojima, S., and Suzuki, A. (1990). Ultrastructure of papillar cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid-freezing and substitution-fixation method. Plant Cell Physiol. 31, 1207-1219.
- Kusaba, M., and Nishio, T. (1999). Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar *SLG* alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. Plant J. 17, 83-91.
- Kusaba, M., Matsushita, M., Okazaki, K., Satta, Y., and Nishio, T. (2000). Sequence and structural diversity of the *S* locus genes from different lines with the same self-recognition specificities in *Brassica oleracea*. Genetics 154, 413-20.
- Kusaba, M., Nishio, T., Satta, Y., Hinata, K., and Ockendon, D. (1997). Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I *SLG* alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: implications for the evolution and recognition mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94, 7673-8.
- Lalonde, B. A., Nasrallah, M. E., Dwyer, K. G., Chen, C. H., Barrow, B., and Nasrallah, J. B. (1989). A Highly conserved *Brassica* gene with homology to the *S*-locus-specific glycoprotein structural gene. Plant Cell 1, 249-258.
- Larsson, C., Widell, S., and Kjellbon, P. (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. Methods Enzymol. 148, 558-568.
- Liu, Y. G., and Whittier, R. F. (1994). Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads. Nucleic Acids Res. 22, 2168-9.

- Luu, D. T., Heizmann, P., and Dumas, C. (1997). Pollen-stigma adhesion in kale is not dependent on the self- (in) compatibility genotype [In Process Citation]. *Plant Physiol.* 115, 1221-30.
- Matsubayashi, Y., Yang, H., and Sakagami, Y. (2001). Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends Plant Sci.* 6, 573-7.
- 松木順子 (1992) アブラナ科植物の自家不和合性に関する生物有機化学的研究. 修士論文 (東京大学)
- McDonald, N. Q., and Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421-4.
- Michelmore, R. W., Paran, I., and Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 9828-32.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-5.
- 中川智文 (2000). アブラナ科植物の花粉表層蛋白質群の機能解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1988). The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and structure. *Heredity* 61, 274.
- Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1993). Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5, 1325-1335.
- Nasrallah, M. E., and Wallace, D. H. (1967). Immunogenetics of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Heredity* 22, 519-527.

- Nasrallah, M. E., Kandasamy, M. K., and Nasrallah, J. B. (1992). A genetically defined trans-acting locus regulates *S*-locus function in *Brassica*. *Plant J.* 2, 497-506.
- Nasrallah, J. B., Rundle, S. J., and Nasrallah, M. E. (1994). Genetic evidence for the requirement of the *Brassica S*-locus receptor kinase gene in self-incompatibility response. *Plant J.* 5, 373-384.
- Nasrallah, J. B., Kao, T.-H., Chen, C.-H., Goldberg, M. L., and Nasrallah, M. E. (1987). Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the *S* locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 326, 617-619.
- Nettancourt, D. D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms*. (New York: Springer-Verlag), pp. 1-230.
- Nettancourt, D. D. (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. (New York: Springer-Verlag), 1-23.
- Nishio, T., and Hinata, K. (1977). Analysis of *S*-specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity* 38, 391-396.
- Nishio, T., and Kusaba, M. (2000). Sequence diversity of *SLG* and *SRK* in *Brassica oleracea* L. *Ann. Bot.* 85, 141-146.
- Nishizawa, N., and Isogai, A. (1993). アブラナ科植物の自家不和合性と乳頭細胞像. 電子顕微鏡 28, 23-29.
- Nou, I. S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (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. (1985). Genetics and physiology of self-incompatibility in *Brassica*. In *Plant Cell/Cell Interactions*, I. Sussex, A. Ellingboe, M. Crouch and R. Malmberg, eds. (New York: Cold Spring Harbor Press), pp. 1-6.
- Okazaki, K., and Hinata, K. (1984). Analysis of *S*-alleles and *S*-glycoproteins in F_1 -hybrid

varieties of *Japanese radish* (*Raphanus sativus* L.). *Japan. J. Breed.* 34, 237-245.

Okazaki, K., Kusaba, M., Ockendon, D. J., and Nishio, T. (1999). Characterization of *S* tester lines in *Brassica oleracea*: polymorphism of restriction fragment length of *SLG* homologies and isoelectric points of *S*-locus glycoproteins. *Ther. Appl. Genet.* 98, 1329-1334.

Pastuglia, M., Ruffio-Chable, V., Delorme, V., Gaude, T., Dumas, C., and Cock, J. M. (1997). A functional *S* locus anther gene is not required for the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9, 2065-76.

Piffanelli, P., Ross, J. H. E., and Murphy, D. J. (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* 11, 65-80.

Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R. W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7, 974-985.

Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286, 1697-700.

Shiba, H., Hinata, K., Isogai, A., and Suzuki, A. (1995). Breakdown self-incompatibility in *Brassica* by the antisense RNA of the *SLG* gene. *Proceed. Japan Academy* 71, 81-83.

Shiba, H., Kimura, N., Takayama, S., Hinata, K., Suzuki, A., and Isogai, A. (2000). Alteration of the self-incompatibility phenotype in *Brassica* by transformation of the antisense *SLG* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1016-24.

Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., Che, F. S., Suzuki, G., Watanabe, M., Hinata, K., and Isogai, A. (2001). A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* 125, 2095-103.

Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimosato, H., Che, F. S., Satta, Y., Ito, A., Takada,

Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2002). Dominant/recessive relationship in pollen expression of self-incompatibility is determined by the transcription level of the pollen determinant gene in *S*-heterozygotes of *Brassica*. *Plant Cell* 14, 491-504.

Shiu, S. H., and Bleeker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE*, <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/oc.sigtrans;2001/113/re22>.

Silva, N. F., Stone, S. L., Christie, L. N., Sulaman, W., Nazarian, K. A., Burnett, L. A., Arnoldo, M. A., Rothstein, S. J., and Goring, D. R. (2001). Expression of the *S* receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. *Westar* leads to the allele-specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Genet. Genom.* 265, 552-9.

下里裕子 (1999). アブラナ科植物の自家不和合性における花粉側 *S* 遺伝子産物の検索. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

佐々木径一 (1999). アブラナ科植物の花粉側自家不和合性因子 SP11-8 の構造研究. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Stahl, R. J., Arnoldo, M., Glavin, T. L., Goring, D. R., and Rothstein, S. J. (1998). The self-incompatibility phenotype in *Brassica* is altered by the transformation of a mutant *S* locus receptor kinase. *Plant Cell* 10, 209-18.

Stanchev, B. S., Doughty, J., Scutt, C. P., Dickinson, H., and Croy, R. R. (1996). Cloning of *PCPI*, a member of a family of pollen coat protein (PCP) genes from *Brassica oleracea* encoding novel cysteine-rich proteins involved in pollen-stigma interactions. *Plant J.* 10, 303-13.

Stead, A. D., Roberts, I. N., and Dickinson, H. G. (1980). Pollen-stigma interaction in *Brassica oleracea*: the role of stigmatic proteins in pollen grain adhesion. *J. Cell. Sci.* 42, 417-23.

Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (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.

Stephenson, A. G., Doughty, J., Dixon, S., Elleman, C., Hiscock, S., and Dickinson Hugh, G. (1997). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating. *Plant J.* 12, 1351-1359.

Stone, S. L., Arnoldo, M., Goring, D. R., Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARCI* antisense transgenic plants. *Science* 286, 1729-31.

梶原穂. (2001). アブラナ科植物の自家不和合性を支配する遺伝子座のゲノム解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., and Hinata, K. (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.

Suzuki, G., Watanabe, M., Toriyama, K., Isogai, A., and Hinata, K. (1995). Molecular cloning of members of *S*-multigene family in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol.* 36, 1273-1280.

Suzuki, G., Watanabe, M., Toriyama, K., Isogai, A., and Hinata, K. (1996). Expression of *SLG*, and *SRK*, genes in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 37, 866-869.

鈴木貴和 (1994). 役にたつ免疫実験法 第2版. (講談社), pp. 37-48.

Suzuki, T., Kusaba, M., Matsushita, M., Okazaki, K., and Nishio, T. (2000). Characterization of *Brassica* *S*-haplotypes lacking *S*-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* 482, 102-8.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (2000). The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403, 913-6.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Watanabe, M., Toriyama, K., Isogai, A., and Hinata, K. (1999).

Introduction of *SLG* (*S* locus glycoprotein) alters the phenotype of endogenous *S* haplotype, but confers no new *S* haplotype specificity in *Brassica rapa* L. *Plant Mol. Biol.* 40, 659-68.

高山誠司 (1986b). アブラナ科植物の自家不和合性にかかわる *S* 遺伝子特異糖タンパク質の化学. 博士論文 (東京大学)

Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1986). Isolation and some characterization of *S* -locus-specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1673-1676.

Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1987). Sequences of *S*-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 318, 263-267.

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

Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Asano, K., Hara, M., Che, F. S., Watanabe, M., Hinata, K., and Isogai, A. (2000b). Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with *S* locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 3765-70.

竹原康治 (1997). アブラナ科植物の自家不和合性に関与する花粉側 *S* 遺伝子産物の検索. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Tantikanjana, T., Nasrallah, M. E., Stein, J. C., Chen, C.-H., and Nasrallah, J. B. (1993). An alternative transcript of the *S* locus glycoprotein gene in a class II pollen-recessive self-Incompatibility haplotype of *Brassica oleracea* encodes a membrane-anchored protein. *Plant Cell* 5, 657-666.

Taylor, L. P., and Hepler, P. K. (1997). Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48, 461-491.

- The Arabidopsis Genome Initiative. (2001). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Toriyama, K., Stein, J. C., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1991). Transformation of *Brassica oleracea* with an *S*-locus gene from *B. campestris* changes the self-incompatibility phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 81, 769-776.
- Trick, M., and Flavell, R. B. (1989). A homologous *S* genotype of *Brassica oleracea* express two *S*-like genes. *Mol. Gen. Genet.* 218, 112-117.
- Trotochaud, A. E., Jeong, S., and Clark, S. E. (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* 289, 613-7.
- Tsuji, T., Nakagawa, R., Sugimoto, N., and Fukuhara, K. (1987). Characterization of disulfide bonds in recombinant proteins: reduced human interleukin 2 in inclusion bodies and its oxidative refolding. *Biochemistry* 26, 3129-34.
- Walker, J. C., and Zhang, R. (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the *S*-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 345, 743-746.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J., Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-3.
- Watanabe, M., Ito, A., Takada, Y., Ninomiya, C., Kakizaki, T., Takahata, Y., Hatakeyama, K., Hinata, K., Suzuki, G., Takasaki, T., Satta, Y., Shiba, H., Takayama, S., and Isogai, A. (2000a). Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *FEBS Lett.* 473, 139-44.
- Watanabe, M., Suzuki, G., Takayama, S., Isogai, A., and Hinata, K. (2000b). Genetic organization of the *SLG/SRK* region of the *S* locus in *Brassica species*. *Ann. Bot.* 85, 155-160.
- Watanabe, M., Suzuki, G., Toriyama, K., Takayama, S., Isogai, A., and Hinata, K. (1999). Two anther-expressed genes downstream of *SLG*₉: identification of a novel *S*-linked gene specifically

expressed in anthers at the uninucleate stage of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. Sex. Plant Reprod. 12, 127-134.

Watanabe, M., Takasaki, T., Toriyama, K., Yamakawa, S., Isogai, A., Suzuki, A., and Hinata, K. (1994). A high degree of homology exists between the protein encoded by *SLG* and the *S* receptor domain encoded by *SRK* in self-incompatible *Brassica campestris* L. Plant Cell Physiol. 35, 1221-1229.

Wolters-Arts, M., Lush, W. M., and Mariani, C. (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. Nature 392, 818-21.

Yamakawa, S., Shiba, H., Watanabe, M., Shiozawa, H., Takayama, S., Hinata, K., Isogai, A., and Suzuki, A. (1994). The sequences of *S*-glycoproteins involved in self-incompatibility of *Brassica campestris* and their distribution among *Brassicaceae*. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 921-925.

Yamakawa, S., Watanabe, M., Hinata, K., Suzuki, A., and Isogai, A. (1995). The sequences of *S*-receptor kinases (*SRK*) involved in self-incompatibility and their homologies to *S*-locus glycoproteins of *Brassica campestris*. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 161-162.

Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (1994). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. J. Biol. Chem. 269, 20172-8.

Yu, K., Schafer, U., Glavin, T. L., Goring, D. R., and Rothstein, S. J. (1996). Molecular characterization of the *S* locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. Plant Cell 8, 2369-2380.