

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約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 *GP1* 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) 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 *GP1* の相同性は大変低いものであったが、LA-PCR 法や BAC クローンの解析から、両系統の *GP1* 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 S_9 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葯発現遺伝子 *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 *GP1* 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* は葯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ジスルフィド結合を形成した(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、*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 ^{125}I 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* 遺伝子特異的に強く結合 ($K_d = 1 \text{ nM}$) することが判明した。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。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 下里裕子

自家不和合性は、植物において自殖劣勢を防ぐための機構として、発達してきたものと考えられ、正常な両性花において、自己の花粉では受精できない性質と定義される。ここでは、花粉と雌ずいの間で、巧妙な自他識別機構が存在すると考えらる。こうした自家不和合性の現象は古くから知られており、それを制御するS遺伝子座という概念が提唱されていた。典型的な孢子体型自家不和合性を示すアブラナ科植物では、S遺伝子の産物として、雌ずいのS遺伝子産物の本体であるS-レセプターキナーゼ(SRK)、および、その細胞外ドメインと相同なS糖タンパク質(SLG)については明かであったものの、花粉側のS遺伝子産物や自他識別反応の分子機構については不明であった。申請者は、この分野の永年の課題であった花粉因子を単離し、さらに、雌ずいにおける花粉因子の受容機構を明らかにすることに成功して、自他識別機構の根幹を示す新たなモデル図を提唱した。本論文は、その過程と結果を記載したもので、序論と3章および総括からなる。

申請者はまず、序論において植物における自家不和合性の現象、意義、種類等について概観した後、本研究のテーマであるアブラナ科植物の自家不和合性について、これまでに知られていることについて概説し、花粉因子を明らかにしようとする本研究の意図を述べた。

第1章ではまず、蛍光ディフュージョンディスプレイ法によって見いだされていた、花粉/葯で発現し、S遺伝子系統間で多型を示す一群の遺伝子の塩基配列を決定し、その中から花粉因子の候補遺伝子SP11を明らかにした。さらに、SP11の発現時期、発現部位を示し、また、その発現タンパク質が、生物検定系によって、花粉因子の機能を有することを示し、これが花粉因子本体である事を証明した。

第2章では、SP11の発現タンパク質の抗体を用いて、SP11が成熟花粉表層に存在することを見るとともに、この抗体を用いての免疫沈降によって、花粉よりSP11を精製し、その分子量を測定して、花粉因子が単量体として存在し、分子内に4対のS-S結合を持つことを見いだした。さらに、化学的に合成したSP11が花粉因子活性を有することを示した。

第3章では、SP11が花粉因子として、雌ずいのS遺伝子産物であるSRKなどと、ど

のような相互作用を示すかを，合成SP11を用いて詳細に検討し，SP11は雌ずいの膜面分中のSRKとSLGの複合体にS遺伝子型特異的に受容されること，又，その結果，SRKの細胞内のキナーゼ領域がリン酸化されることを明かとした。さらに総括として，本研究によって得られた成果をまとめ，自家不和合性における自他識別反応のモデル図を提唱するとともに，今後の研究課題について述べている。

以上のように本論文は，アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別反応にかかわる花粉因子を単離するとともに，それが，雌ずい因子であるSRK/SLG複合体のリガンドとして働き，その結果，SRKの細胞内ドメインのリン酸化がおきることを，分子生物学的，ならびに生化学的手法を用いて，明快に示したもので，これによって，アブラナ科植物における自他識別機構のモデル図を確立するとともに，新たな且つ重要な多くの知見を示した。この成果は，学術上，応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は，本論文が，博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。