

論文内容の要旨

申請者氏名 村 瀬 浩 司

多くの両性花型の被子植物は自家不和合性と呼ばれる分子機構を持ち、他家受精を進め、種の遺伝的多様性を維持している。アブラナ科植物の自家不和合性は S と呼ばれる 1 遺伝子座の複対立遺伝子 (S 遺伝子) によって支配される。これまでの研究から自他識別に関わる S 遺伝子座の柱頭側決定因子および花粉側決定因子が同定されたが、そのシグナル伝達経路や花粉拒絶反応の分子機構はほとんど未解明のままである。

Brassica rapa var. Yellow Sarson は自家和合性の変異株で、 S 遺伝子以外に M (modifier) 遺伝子に変異を持つとされている。本株の持つ m 変異は劣性の変異であり、 M 遺伝子産物は SRK の下流で重要な働きをしていると考えられてきた。本研究は、アブラナ科植物の自家不和合性におけるシグナル伝達機構の解明を目指し、 M 遺伝子の実体を明らかにすること目的としたものである。

第 1 章では、まず、 M 遺伝子のポジショナルクローニングを行うために、Yellow Sarson $S_{f2}S_{f2}mm$ の和合性原因遺伝子の内、 m 遺伝子のみを野生株 *B. rapa* S_8S_8MM に交配により導入した。次に、 M 遺伝子座近傍の遺伝地図を作製し、 M 遺伝子座を 0.8 cM の領域に絞り込んだ。この過程で、これまで発表されていた M 遺伝子が MOD 遺伝子であるという説を完全に否定した。

第 2 章では、BAC クローンを用いての染色体歩行により、最終的に約 50 kbp の領域まで M 遺伝子座を絞り込んだ。この領域にあるプロテインキナーゼをコードする遺伝子を *M locus protein kinase* (MLPK) と命名した。 m 変異体の MLPK は、キナーゼドメインの 1 塩基置換により、グリシンがアルギニンに変わっており、その変異型 MLPK タンパク質はキナーゼ活性を欠くことを示した。ついで、一過的に柱頭に遺伝子を発現させる試験法を確立し、MLPK が m 変異を相補することを確認し、 M 遺伝子の本体は MLPK であると結論づけた。

第 3 章では、MLPK タンパク質の生化学的、及び分子生物学的性質について検討した。MLPK は 404 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端にミリスチル化モチーフを持ち、膜に結合している可能性を示し、GFP 融合タンパク質として MLPK は細胞膜に局在することを確認した。また柱頭抽出物の生化学的分画によっても MLPK が膜アンカー型タンパク質であることを示唆した。最後に以上を総括して、自家不和合性のシグナル伝達系で現在知られているタンパク質群をまとめて、シグナル伝達機構のモデルを示した。

以上のように、本研究は M 遺伝子のポジショナルクローニングによって膜アンカー型プロテインキナーゼである MLPK がアブラナ科植物の自家不和合性シグナル伝達に重要な因子であることを明らかにしたものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村 瀬 浩 司

植物の自家不和合性の現象は古くから知られていたが、どのようにして植物が自己を認識するかは長い間の謎であった。アブラナ科植物は孢子体型自家不和合性を示す典型的な植物であり、その性質は、アブラナ科蔬菜類の F1 種子の採取にも利用されている重要な農業形質でもある。アブラナ科植物の自家不和合性のこれまでの研究は、この現象を支配する S 遺伝子座の解明に重点がおかれていたが、S 遺伝子座にコードされる花粉因子、雌ずい因子の解明によって、その中心がシグナル伝達に移りつつある。こうした中であって、*Brassica rapa* var. Yellow Sarson 株は、自家和合変異株であり、遺伝学的な解析から、S 遺伝子座以外に M 遺伝子座に変異があるとされてきた。この M 遺伝子座の変異は、劣性で、S 遺伝子座系の下流にあるとされ、シグナル伝達系の研究には格好の対象であるが、その実体はあいまいなままであった。

本申請者は、まず、Yellow Sarson 株の *m* 変異を、これまで主として使用してきた *B. rapa* S8 系統に移すとともに、遺伝学的な解析を行った。その過程で、アメリカのグループが発表してきた、M 遺伝子はアクアポリン様分子をコードする MOD 遺伝子であるという説を完全に否定した。続いて、BAC クローンを用いて、M 遺伝子座を絞り込み、最終的に 50k bp の領域内の 12 の予測 ORF を明らかにした。このうち、プロテインキナーゼをコードする遺伝子に着目して、これを MLPK (*M* locus protein kinase) と名付け、詳細な解析を行った。その結果、*m* 変異体では、キナーゼ活性を持たない 1 塩基変異であることを見いだすとともに、MLPK が、新たにこの遺伝子の機能を証明するために考案した検定系で、*m* 変異を相補することを示し、MLPK が M 遺伝子の本体であることを明らかにした。さらに、M 遺伝子産物が、ミリスチル化され、膜に局在する可能性を強く示した。MLPK は膜アンカー型プロテインキナーゼであり、レセプターキナーゼと進化的に近縁であるが細胞外ドメインを持たない receptor like cytosolic kinase (RLCK) ファミリーの一員である。

以上のように、本論文は、アブラナ科植物での自己認識のシグナル伝達系で、その流れを正に制御する因子を初めて明らかにしたもので、アブラナ科植物の自家不和合性研究にとって、一里塚となる研究論文である。同時に、RLCK ファミリーの一員である MLPK が植物のレセプターキナーゼを介するシグナル伝達に関わっていることを示す初めてのものであり、今後、種々の植物でのシグナル伝達系の研究に大きな影響を与えるものであって、本論文は、応用上、学術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。