

氏 名(本籍) わた なべ まさ お
渡 邊 正 夫

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 9 1 号

学位授与年月日 平 成 6 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 Isolation and characterization of SRK and SLG genes, SRA and SA-proteins in self-incompatible Brassica campestris L.
(自家不和合性 Brassica campestris L.におけるSRK, SLG遺伝子, SRA, SA-タンパク質の単離とその特性解析)

論文審査委員(主 査) 教 授 日 向 康 吉
教 授 亀 谷 寿 昭
教 授 江 原 淑 夫

論文内容要旨

緒言

被子植物の多くには、受粉時に自己・非自己の花粉を認識して、非自己花粉でのみ受精して近親交配を妨げる性質があり、自家不和合性と呼ばれている。アブラナ科植物は孢子体型自家不和合性を有し、1座位に100を越す複対立遺伝子、*S*、が存在して、それらの一致・不一致によって自己・非自己の認識が起きると説明されている。近年、自家不和合性に関連した幾つかの遺伝子やタンパク質が単離され、*S*遺伝子との関連性、自己・非自己の認識機構への関与が検討されている。

本研究では、まずアブラナ科の自家不和合性研究に関して、近年の研究の発展を抄録し、関連する遺伝子の関係について検討し(第1章)、その中でも特に認識反応に直接関与していると考えられる*SLG*遺伝子と*SRK*遺伝子を*Brassica campestris*の柱頭から単離し、その発現、*S*遺伝子との連鎖を調べ、それら遺伝子間の関連性を検討した(第2章)。一方、柱頭に存在し、*SLG*と約55%相同性のあるNS糖タンパク質(*SRA*)の変異、遺伝性、自家不和合性との関連性について検討した(第3章)。また、これまで検出されていなかった花粉側での*S*遺伝子産物の検出を試み、葯壁中に柱頭の*SLG*抗体と反応するタンパク質を検出し、その特性について検討した(第4章)。これらの結果を踏まえて自家不和合性の認識反応に関与する遺伝子について考察したものである。

第1章 アブラナ科植物の自家不和合性研究の現状

本章では自家不和合性研究について抄録するとともに自家不和合性に関連してクローニングされた遺伝子を筆者が関係した研究も含めて検討した。*S*遺伝子に関連するものとして、*SLG*, *SRK*, *SRA*, *SRB*, *SAP*の遺伝子があり(Table 1-1)、前者4遺伝子間のアミノ酸レベルでのホモロジーは50%以上と高い値を示す(Table 1-2)。これらは多重遺伝子族を形成し、特に自家不和合性に直接関与している*SLG*と*SRK*が注目されている。

第2章 自家不和合性*Brassica campestris*における*SLG*と*SRK*のクローニングとその特徴

既存の研究から、柱頭に存在するS糖タンパク質(*SLG*)が自家不和合性に関与していると考えられる。そして、この遺伝子と連鎖したレセプター型のプロテイン

キナーゼ(*SRK*)が、*B. oleracea*において単離され、構造解析がなされている。本研究では、*SLG*と*SRK*を*B. campestris*の優性系統 S^9 から単離し、自家不和合性とこれらの遺伝子間の関係を検討した。

B. campestris S^9 ホモ系統の柱頭cDNAライブラリーを鋳型として、Sドメインとキナーゼドメインにおいて高度に保存されている領域をプライマーに用いてPCRを行ったところ、約700bpの大きさのDNA断片が増幅された。この増幅産物は、その塩基配列から推定して、*SRK*⁹の一部であると考えられた。次に、この断片をプローブとして、 S^9 柱頭cDNAライブラリーをスクリーニングし、最長のクローンについて塩基配列を決定した(Fig. 2-1)。これと平行して、 S^9 柱頭cDNAライブラリーから*SLG*⁹クローンの単離も行い、塩基配列を決定した。*SRK*⁹は疎水性のシグナルペプチドに続いて、*SLG*⁹と98%の相同性のあるSドメインを持ち、膜貫通領域と考えられる疎水性の高い領域に連なり、その後ろにセリン/スレオニン型のプロテインキナーゼドメインを有していることを明らかにした(Fig. 2-2)。

S遺伝子と*SRK*、*SLG*遺伝子の連鎖について検討するために、まず S^9S^9 ヘテロ個体の自殖次代の各個体のS遺伝子型を花粉管の行動によって決定した。続いて、遺伝子型の決定された個体について*SRK*、*SLG*遺伝子のRFLPパターンの分離を調べた。その結果、これら2つの遺伝子はいずれもS遺伝子の分離と完全に一致し、S遺伝子座にあることを示した(Fig. 2-3)。

SRK、*SLG*遺伝子はいずれも柱頭でのみ特異的に発現し、葯や葉においては発現は観察されなかった(Fig. 2-4)。

*Brassica campestris*においても、*SRK*のレセプター部分と*SLG*は98%と高い相同性を示し、*SLG*と*SRK*はタンデムに並んで、S遺伝子と連鎖していることから考えると、この両者の存在が自家不和合性認識反応に深く関わっているものと考えられる。

第3章 自家不和合性*Brassica campestris*に存在するNS糖タンパク質の変異と遺伝について

アブラナ科植物の柱頭には*SLG*と構造及び発現部位が類似したNS糖タンパク質(SRA)が検出されている。本研究では、このSRAの自家不和合性との関連性を明らかにするために、その遺伝性、変異、自家不和合性との関連について抗SRA抗体

を用いて検討した。

S^8 ホモ系統の柱頭抽出物を抗SRA¹抗体を用いたIEF-イムノブロット法で検討すると、3種類(SRA¹ホモ、SRA⁴ホモ、SRA¹SRA⁴ヘテロ)のSRAのパターンに分類できた。いずれのSRAにおいても数本のバンドがはしご状に検出された。また、これらのSRAの分子量は同一であった。次に、 S^8S^9 ヘテロ・SRA¹SRA⁴ヘテロ個体の自殖世代についてSRAの遺伝を調べた。交配による花粉管の行動とSLGの分離は完全に一致した。一方、SRAの分離は1遺伝子座によって説明され、SLGの分離とは相関しなかった。(Table 3-1, Fig. 3-1)。日本及びトルコの自家不和合性*B. campestris*から抽出した30のSホモ系統のSRAの変異について調べた。SLG遺伝子の変異とは異なり、SRAは等電点の異なる4種類しか検出されなかった(Fig. 3-2)。SRAは*Brassica*属の近縁野生種にも幅広く存在し、そのIEF分析像はいずれもはしご状のバンドパターンとして検出され(Fig. 3-3)、受粉反応において必要なタンパク質ではないかと考えられた。

本研究から、SRAとSLGが座位の全く異なる遺伝子に支配されており、SRAは自家不和合性とは直接関係しないことを明らかにした。その存在の一般性から考えると、受粉反応には何らかの重要な役割を担っていると考えられる。

第4章 自家不和合性*Brassica*属植物の葯に存在するS糖タンパク質様タンパク質について

アブラナ科自家不和合性において、花粉側のS遺伝子産物の検出が問題となっている。本研究では、マウスを用いて特異性の高い抗SLG⁸抗体を得、イムノブロット法により、葯中にSLGと相同性のあるタンパク質を検出し、その諸特性を明らかにした。

S^8, S^9, S^{12} の柱頭をイムノブロット法によって分析を行うと、それぞれのSLGを含んだ数本のバンドと反応する特異性の高い抗体を得た。この抗体を用いて S^8, S^9, S^{12} の葯抽出物を分析したところ酸性側に1本のバンドが検出された。しかし、S遺伝子の違いによる等電点の差異は観察されなかった(Fig. 4-1)。このタンパク質をSAP(S-glycoprotein-like anther protein)と呼ぶことにした。

葯抽出物を2次元電気泳動によって分離し、イムノブロット法でSAPを検出して分子量の推定するとともに、ConA-peroxidase法を用いてSAPのConA反応性につい

て検討を行った。その結果、このSAPは29kDa, 29' kDa, 83kDaの3つのスポットとして検出されたが、ConA-peroxidase法ではこのスポットに対応するものは検出されなかった(Fig. 4-2)。このことから、このSAPには少なくともSLGと同じ糖鎖がないものと考えた。

S^0 ホモ系統を材料とし、葯でのSAPの形成過程を分析した。SAPは、1核期前～中期(開花17日前)頃から発現し、2核期後期～3核期前期(開花7日前)頃に発現量は最大となった。柱頭のSLGと比較して約6日ほど早く発現し、発現量が最大となる時期も異なっていた(Fig. 4-3)。

次にこのSAPが、花粉に存在するのか葯壁に存在するのかを検討した。Tris緩衝液、筆のいずれの方法で花粉を除去してもSAPは葯壁側に存在した。また、洗浄に用いた緩衝液中にもこのSAPは検出された。しかし、花粉抽出物にこのタンパク質が存在するのかははっきりしなかったが、アルカリ側に葯壁にはない数本のバンドが検出された。このSAPは葯壁中に可溶性形で存在していると考えられた。

SAPは*Brassica*属とその近縁野生種に広く存在していたが、種によって等電点が若干異なることがわかった(Fig. 4-4)。

こうしたことから、葯中には等電点、分子量、糖鎖の有無に関しては異なるが、血清反応的に類似した構造を持ったタンパク質が存在していることを明らかにした。

結語

本研究では、アブラナ科植物の自家不和合性に関連した柱頭側の遺伝子(*SLG*, *SRK*, *SRA*, *SRB*)のうちで、*SLG*, *SRK*, *SRA*遺伝子に関して、*B. campestris*を材料としてその諸特性を明らかにした。柱頭に発現している*SLG*と*SRK*が*S*遺伝子と完全に連鎖していることから、*SLG*と*SRK*は自家不和合性反応における自己・非自己の認識に強く関与していると思われる。しかし、柱頭で発現し*SLG*と約55%相同性のある*SRAI*は、自家不和合性の認識反応に直接関係していないことも明らかにした。

一方、花粉・葯側において、柱頭のSLGの抗体と反応するSAPの存在を明らかにしたが、*S*遺伝子型によって、等電点、分子量に変異が見られなかった。SAPは*SLG*あるいは*SRK*遺伝子からの異なったプロセッシングによる産物か、*SLG*, *SRK*遺伝子以外の遺伝子産物でないかと考えた。

Table 1-1 Tentative terminology of S-relevant genes and glycoproteins used

Proposed name of gene at DNA level	Proposed name of corresponding proteins	Described proteins or DNA and references
<i>SLGⁱ(B.oleracea)</i>	SLG ⁱ (B.oleracea)	SLSG ⁱ :S-locus-specific glycoprotein Nasrallah et al. (1987) Dwyer et al. (1989) Trick and Flavell (1989)
<i>SLGⁱ(B.campestris)</i>	SLG ⁱ (B.campestris)	S-glycoprotein Takayama et al. (1987) Isogai et al. (1987)
<i>SRKⁱ(B.oleracea)</i>	SRK ⁱ (B.oleracea)	SRK:S receptor kinase Stein et al. (1991)
<i>SRAⁱ(B.campestris)</i>	SRA ⁱ (B.campestris)	NS-glycoprotein Isogai et al.(1988,1991) Watanabe et al. (1992)
<i>SRAⁱ(B.oleracea)</i>	SRA ⁱ (B.oleracea)	SLR1:S-locus-related glycoprotein-1 Lalonde et al. (1989) Trick (1990) Umbach et al. (1990)
<i>SRB(B.oleracea)</i>	SRB(B.oleracea)	SLR2:S-locus-related glycoprotein-2 Scutt et al. (1990) Boyes et al. (1991)
-	SAP	SA-protein:S-glycoprotein-like anther protein Watanabe et al. (1991)

i: allelic gene number

Genes are symbolized with three letters, and allelic genes are indicated with superscripts as in many literatures, though subscripts have been used in the case of self-incompatibility. Proteins are presented in Roman and the corresponding genes at DNA level in italics.

Table 1-2 Averaged homology (%) of amino acid sequences among SLG (D), SLG (R), SRA, and SRB

	SLG(D)	SLG(R)	SRA	SRB
SLG(D)	77.5	68.5	56.1	64.3
SLG(R)		91.2	52.6	85.3
SRA			92.5	52.0
SRB				97.9

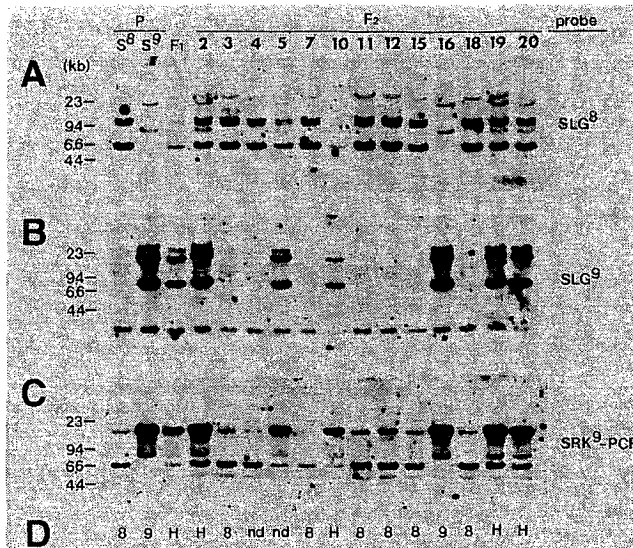


Fig. 2-3. Restriction fragment length polymorphism analysis of an F_2 progeny segregating for the S^8 and S^9 self-incompatibility alleles. Genomic DNA was isolated from parental (P) plants homozygous for either the S^8 or S^9 allele, F_1 hybrid between S^8 - and S^9 -homozygote, and from 13 F_2 progeny. The DNA was digested with *Bam*HI or *Hind*-III and analyzed by DNA gel blot hybridization. Segregation patterns observed after hybridization with probes specific for SLG^8 -cDNA (A), SLG^9 -cDNA (B) and SRK^9 -PCR fragment (C) are shown. (D) Incompatibility phenotype of each plant was determined by test pollination. 8; S^8 -homozygote, 9; S^9 -homozygote, H; S^8S^9 -heterozygote, nd; not determined.

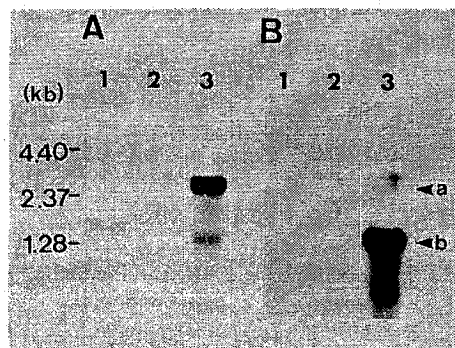


Fig. 2-4. RNA blot analyses of SRK and SLG transcripts in several organs probed with SRK^9 -PCR fragment (A) and with SLG^9 -cDNA (B). To investigate the expression of SRK^9 and SLG^9 , $1\mu\text{g}$ of poly(A)⁺ RNA was isolated from leaf (lane 1), anther (lane 2) and stigma at a few days before flowering (lane 3) of S^9 -homozygote. The hybridized signals were obtained only in stigma at 2.85 and 1.43kb. The higher band (arrowhead a) corresponds to SRK^9 transcript and the lower one (arrowhead b) to SLG^9 based on their molecular sizes. No band was detected in either leaf or anther even after long exposure. Size markers are indicated to the left of the gel.

Table 3-1 Classification of the selfed progeny to S genotypes by test crosses

Identification number of progeny plant	Test cross					Expected S genotype
	xS^8 1)	xS^9	self	$S^8 \times$	$S^9 \times$	
1,2,3,4;7,11,14,17,19	-2)	+	-	-	+	S^8S^8
6,8,12	+	-	-	+	-	S^9S^9
5,9,13,16,18,20	+	-	-	-	-	S^8S^9

1) xS^8 means F_2 plant (female) \times S^8 tester, and $S^8 \times$ means S^8 tester (female) \times F_2 plant.

2) +: Many pollen tubes penetrated the stigma papilla, compatible.

-: A few or no pollen tubes penetrated the stigma papilla, incompatible.

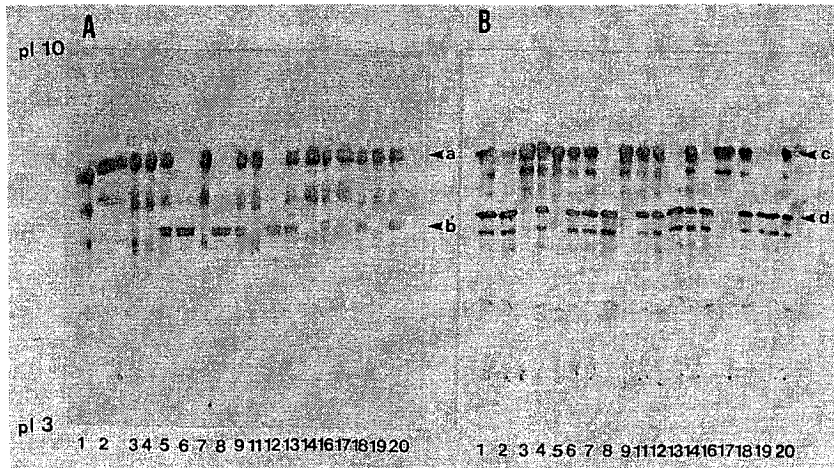


Fig. 3-1 IEF-immunoblot analysis of segregation in F_2 plants of the S^8 - and S^9 -glycoproteins and NS^1 - and NS^4 -glycoproteins, demonstrating that NS -glycoprotein does not cosegregate with the S -glycoprotein. The stigma proteins of plants numbered under the lanes were detected with S^8 -antiserum (A) and NS^1 -antiserum (B). Arrowheads indicate S^8 - (a) and S^9 - (b) glycoproteins, and NS^4 - (c) and NS^1 - (d) glycoproteins, respectively.

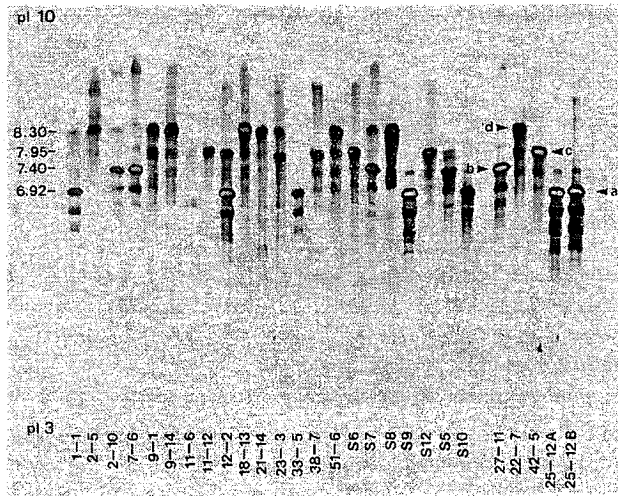


Fig. 3-2 Four types of NS-glycoprotein were visualized by IEF-immunoblotting analysis of 27 different *S*-homozygotes in *B. campestris*. Arrowheads a to d indicate NS¹-, NS²-, NS³- and NS⁴-glycoproteins, respectively. The lanes from the left, 1-1, to S10 are *S*-homozygotes sampled from a naturalized population in Oguni, Japan. The lanes from 27-11 to 25-12 are those sampled from a wild population, from Balcesme, Turkey.

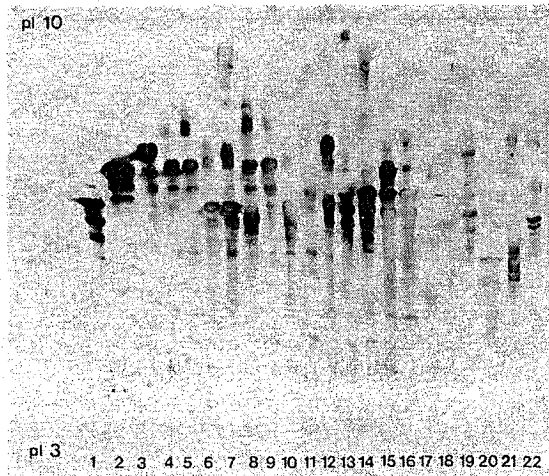


Fig. 3-3 Interspecies variation between NS-glycoproteins from *Brassica* and allies as indicated by their IEF-immunoblot profiles. Lanes 1 to 3: *B. campestris* (NS¹, NS³ and NS⁴). Lanes 4 to 9: *B. oleracea* (S², S¹³, S¹⁴, #162, Kairan-1 and Kairan-2). Lane 10: *B. insularis* (#1). Lanes 11 to 16: *B. napus* (#107, #130, #263, Westar, Senposai-1 and Kugi-1). Lane 17 to 20: *Diplotaxis catholica* (#1), *D. harra* (#7), *D. muralis* (#1) and *D. siifolia* (#4). Lane 21: *Eruca sativa* (#9). Lane 22: *Moricandia arvensis* (#5). # indicates the accession number of the genetic stock at Tohoku University.

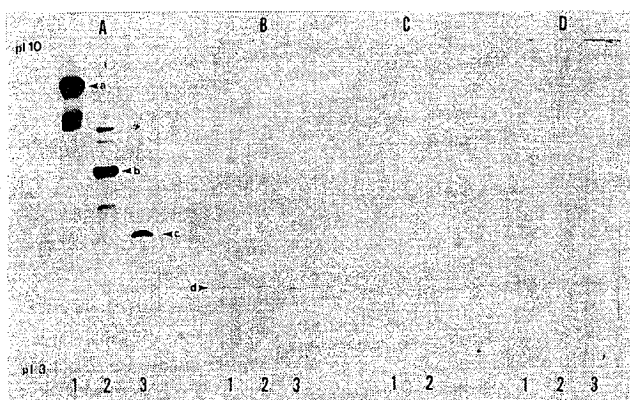


Fig. 4-1. Immunoblot analysis after isoelectric focusing for characterization of the antiserum against S^8 -glycoprotein (S^8 -antiserum).

(A) Reactions of S^8 -antiserum with stigma extracts taken from S^8 - (lane 1), S^9 - (lane 2) and S^{12} - (lane 3) homozygotes. Arrowheads a, b and c indicate S^8 -, S^9 - and S^{12} -glycoproteins, respectively.

(B) Reactions of S^8 -antiserum with anther extracts taken from S^8 - (lane 1), S^9 - (lane 2) and S^{12} - (lane 3) homozygotes. Arrowhead d indicates SA-protein.

(C) Reactions of S^8 -antiserum with laccase from sycamore cells (lane 1) and bromelain from pineapple stems (lane 2) which have oligosaccharide chains similar to those of S-glycoprotein.

(D) Reactions of S^8 -antiserum with extracts from leaves (lane 1), immature seeds (lane 2) and ovaries (lane 3) of the source plant (S^8 -homozygote).

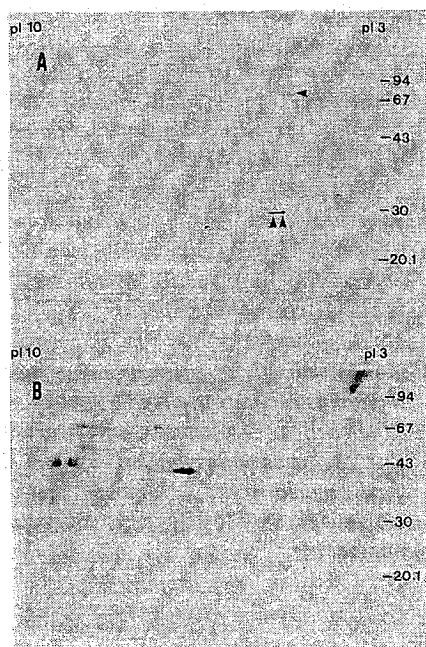


Fig. 4-2. Estimation of molecular weight and reactivity with Con A of SA-protein after two-dimensional electrophoresis (IEF/SDS-PAGE).

Anther extracts taken from S^8 -homozygotes were reacted with antiserum against S^8 -glycoprotein (A) and with Con A (B). Arrowheads indicate SA-proteins. pI 3 and pI 10 indicate the pI values in the first dimension. Molecular-weight standards (kDa) are indicated on the right side.

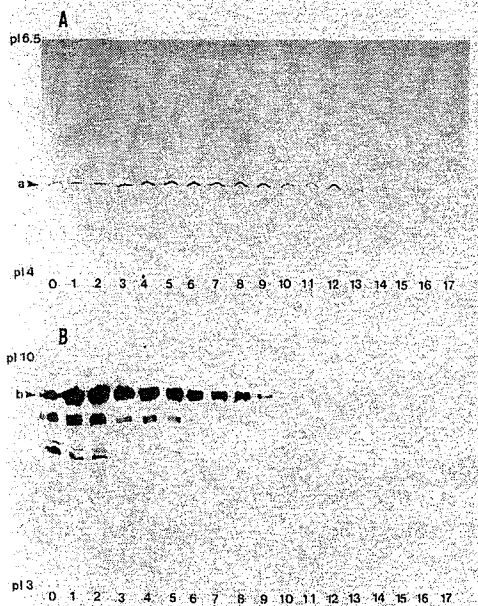


Fig. 4-3. Immunoblot analysis, after isoelectric focusing, with antiserum against S^8 -glycoprotein of extracts of anthers (A) and stigmata (B) from plants at different developmental stages from the youngest bud (lane 17) to the flower in bloom (lane 0). The developmental stage of microspores was determined, by staining of nuclei with DAPI, to be as follows: uninucleate (lanes 17-10), binucleate (lanes 12-4), trinucleate (lanes 6-0). SA-protein appears at the uninucleate stage and its level increases until the binucleate stage, while S-glycoproteins appear at the binucleate stage. Arrowheads a and b indicate SA-protein and S^8 -glycoprotein, respectively.

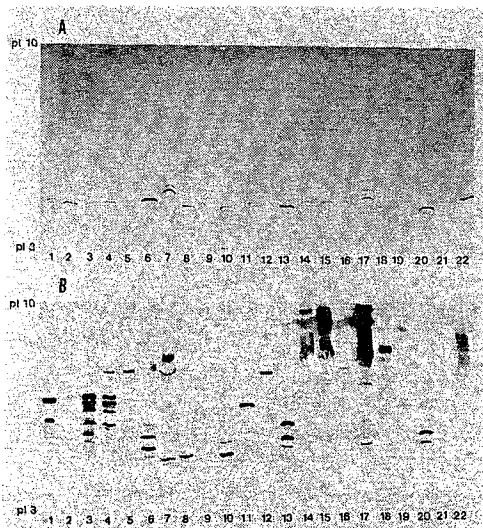


Fig. 4-4. Variations in levels of SA-protein in anthers (A) and S-glycoproteins in stigmata (B) among species in the genus *Brassica* and in related genera, as determined by immunoblot analysis after isoelectric focusing.

Lane 1, *Brassica campestris* (S^9); lane 2, *B. oleracea* (#171); lane 3, *B. oleracea* (S^{14}); lane 4, *B. oleracea* (S^{15}); lane 5, *B. oleracea* (S^2); lane 6, *B. deflexa* (#1); lane 7, *B. nigra* (#138); lane 8, *B. fruticulosa* (#202); lane 9, *B. maurorum* (#1); lane 10, *B. maurorum* (#3); lane 11, *B. insularis* (#1); lane 12, *B. barrelieri* (#103); lane 13, *B. adpressa* (#111); lane 14, *B. campestris* (#146); lane 15, *B. napus* (#119); lane 16, *B. juncea* (#473); lane 17, *B. carinata* (#101); lane 18, *Raphanus raphanistrum* (#8); lane 19, *ErUCA sativa* (#4); lane 20, *E. vesicaria* (#3); lane 21, *Erucaria hispanica* (#3); lane 22, *Cakile maritima* (#3). Numbers in parentheses indicate the S-allele or the accession number (#).

論文審査の要旨

本論文はアブラナ科植物のカブ (*Brassica campestris* L.) を材料として、その自家不和合性の認識反応に関連する遺伝子および特異タンパク質について検討したものである。

まず第一章では従来報告されている遺伝子類の相同性等の調査を行って、関連する遺伝子および特異タンパク質を整理した。

第二章では、関連遺伝子類でも特に注目される SLG (S糖タンパク質) と SRK (Sレセプターキナーゼ) の cDNA を柱頭からクローニングして、それらの特性について検討した。その結果、SLG と SRK は柱頭で特異的に発現し、相互に連鎖し、さらにクラシカルな遺伝分析で明らかになっている S 遺伝子とも連鎖して遺伝することを明らかにした。また、SRK のレセプタードメインが SLG と塩基レベルで 98% の相同性があり、非常に相同性の高いものであることを示した。これらの事実は、自家不和合性にタンパク質のリン酸化を介した情報伝達系が関与していることを示唆している。

第三章では、SLG とホモロジーの高い、SRA タンパク質 (S 関連タンパク質 A) に注目してその特異抗体を作成し、これを用いて SLG との関連性を調べた。SRA は SLG とは独立に遺伝すること、SRA は認識反応には直接は関与していないこと、また SLG には 100 を越す変異体が有ることが予想されているが、SRA には変異性が少なく、日本およびトルコの材料について調べた結果、4 変異体しか認められないことを明らかにした。本研究で得られた知見とその他の情報を総合すると、SRA が SLG の原型である可能性が指摘できる。

第四章では花粉側で認識に関与する特異タンパク質を探索し、SLG タンパク質に対する抗体に反応するタンパク質が葯中に存在し、それは遺伝子型に関わらず等電点が約 5.0 であり、コンカナバリン A 反応性がないこと、それは 1 核期前後の若い葯に形成されることを示した。なお、本章の基となった報文は花粉側で見られる特異タンパク質に関する世界で初めての報告であった。

以上本研究は、アブラナ類の育種の際の、生殖過程制御に用いられている自家不和合性に関して新たな知見を与えたものである。よって、著者は博士 (農学) の学位を授与されるに十分な資格があるものと判定された。