

## アブラナ科植物における自己・非自己認識の分子機構の解明

### Molecular characterization of self/non-self recognition in *Brassica*

研究代表者 大阪教育大学教養学科 助手 鈴木 剛  
Assistant Professor, Lab. of Plant Molecular Genetics, Osaka Kyoiku Univ.  
Go SUZUKI

Self-incompatibility (SI) is the system prevents self-fertilization in plants by recognizing the self-pollen in the pistil. In *Brassica* species, the SI recognition is regulated by the single *S* locus with multiple alleles. *SRK* (for *S* receptor kinase) encoding a membrane associated receptor-like kinase is one of the genes located in the *S* locus region, and has been shown to be involved in the SI recognition in the pistil. In the present research, *SP11* (for *S* locus protein 11) encoding a small cysteine-rich protein was identified in the 76-kb *S*-locus region cloned in a P1-derived artificial chromosome (PAC) vector. *SP11* is expressed specifically in the anther, and its putative amino acids sequence is highly polymorphic between alleles without the signal peptide and conserved cysteine residues. Transgenic *Brassica* plants with the *SP11* transgene changed the phenotype into the incompatibility for their pollen with the *S*-allele specificity of the transgene, indicating that *SP11* is the male determinant of the SI recognition. *SRK* and *SP11* might regulate recognition of self-pollen as a receptor and a ligand, which could interact with allele-specific manner.

#### 1. 研究目的

動物において自己と非自己を認識するシステムとしては免疫系の主要組織適合複合体(MHC)などがあるが、植物においても自己と非自己を識別する自家不和合性という機構が存在する。多くの植物は雌雄同体であり、1つの花に雄しべ(雄性器官)と雌しべ(雌性器官)が極めて近接して存在しているため、自殖しやすい構造をしている。従って、自殖を防ぎ多様性を維持するために、自己の花粉(雄性配偶子)が雌しべに付着した場合、花粉管の伸長が抑制され自家受精しない自家不和合性というシステムが存在している。自家不和合性は、植物で唯一の自己・非自己の認識反応であるという意味で非常に興味深い生命現象であるほか、多くの野菜類がこの現象を利用して種子生産されており、農学的にも実用形質として極めて重要である。

アブラナ科植物では、自家不和合性は1遺伝子座の*S*複対立遺伝子によって制御されている。この*S*遺伝子座に存在している*SRK*という遺伝子がコードするレセプター型プロテインキナーゼが自家不和合性の雌しべ側のレセプターであるということが分かっている。自己か非自己かという花粉からのシグナルが、雌しべ側に伝わる時にリン酸化が関わって

るという事実は、動物の免疫系との類似点から興味深い点である。しかしながら、花粉からのシグナルにあたる*SRK*のリガンドについては、世界の多くの研究者の数十年来の努力をもってしても同定されていなかった。申請者は*S*遺伝子座を76kbのゲノム断片として人工染色体ベクターにクローニングし、その断片上に存在している14種類の遺伝子(*SRK*を含む)を単離した。自家不和合性が1遺伝子座で説明でき、雌しべ側と花粉側の間での組換えが起こらないことから、花粉側のリガンドをコードする遺伝子は*SRK*の極めて近傍に存在していると考えられ、単離済みの遺伝子群のなかにそれが含まれている可能性が高い。

そこで、本研究では*S*遺伝子座を含む76kbのゲノム断片に存在する全遺伝子を解析することにより、自家不和合性の花粉側リガンドを明らかにすることを目指した。ゲノム解析により*S*多重遺伝子族を調べるとともに、花粉側リガンドをコードする遺伝子としての有力な候補と考えられた遺伝子について対立遺伝子間で塩基配列を比較することにより多様性を調査した。さらには、その遺伝子を遺伝子導入することにより自家不和合性への関与を証明した。

## 2. 研究経過

### 2.1. 方法

#### 塩基配列の決定

76kbのS遺伝子座に存在している遺伝子について、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより塩基配列を決定した。また、対立遺伝子についてはRT-PCR法により単離したのものについて同様に塩基配列を決定した。

#### 発現部位の解析

全遺伝子についてRT-PCR法により発現を調べた後、花粉側リガンドの候補遺伝子についてノーザンプロット分析やin situ分析により発現を調べた。プローブはdigoxigeninで標識し、シグナルをNon-RFで検出した。

#### 形質転換実験

候補遺伝子について、ゲノム断片をそのまま挿入したコンストラクトを作製し、アグロバクテリウム法によりアブラナ科植物 (*Brassica campestris*) に遺伝子導入した。選抜マーカーにはカナマイシンを用いた。

#### パルスフィールド実験

複数の対立遺伝子系統から高分子量DNAを単離し、rare cutter enzymeで消化後、パルスフィールド電気泳動により分画し、S遺伝子座上の遺伝子をプローブに用いてサザンプロット分析を行った。プローブはdigoxigeninで標識し、シグナルをNon-RFで検出した。

## 2.2. 結果及び考察

### 花粉側リガンドの候補遺伝子

76kbのS遺伝子座に存在している遺伝子の塩基配列とRT-PCRによる発現分析により、SP11 (S-locus protein 11) が、花粉側リガンドをコードする遺伝子の候補として最もふさわしいことが分かった。

第一に、推定アミノ酸配列からシステイン残基に富んだ小さな分泌型タンパク質をコードしていることが分かった (Fig. 1)。同様な特徴を持つタンパク質がSRK類似タンパク質と結合することが分かっており、この配列の特徴は予想と合致していた。

第二に、発現は雄しべの薬特異的であることがノーザンプロット分析により分かった (Fig. 2)。In situ分析の結果、薬のタペータ細胞で発現していることから、アブラナ科植物の自家不和合性が胞子体的であることと合致していた。従って、有力候補としてSP11に絞り込み、以下の実験を行った。

```
MKSAIYALLCFIFIVSSHVQVEVEANLRKTCV *
HRLNSGGSGCGKSGQHDCEAFYTNKTNQKAFYCNCT * *
SPFRTRYCDCAIKCKVR 83 * * *
```

Fig. 1 Amino-acid sequence of SP11. The putative signal peptides are denoted with boldface italics. The eight cysteine residues in the mature proteins are indicated by asterisks.

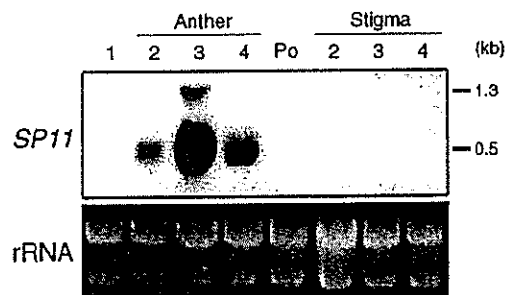


Fig. 2 RNA gel blot analysis of SP11 genes. Total RNA was isolated from flower buds of stage 1 (1), anthers and stigmas of stage 2, 3, and 4 (2, 3, and 4, respectively), and mature pollen grains (Po) of the *B. campestris* S9 haplotype. The cDNA clone of and SP11 was used as probes. The bottom panel shows the results of ethidium bromide-stained rRNA.

### SP11の多様性

他の複数のS対立遺伝子系統からRT-PCR法によりSP11遺伝子の対立遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。その結果、シグナルペプチド部分とシステイン残基は良く保存されていたものの、その他のアミノ酸配列は対立遺伝子間で変異が激しいことが分かった。このことは、SP11が花粉側リガンドであることを強く示唆していた。

### SP11を導入した形質転換アブラナの作出

SP11のゲノム断片 (プロモーター部分と遺伝子部分の両方を含む) をTiプラスミドに連結し (Fig. 3) そのコンストラクトをアグロバクテリウム法により *B. campestris* に導入し、形質転換アブラナを作出した。その結果、導入したSP11のS対立遺伝子特異的に花粉側で自家不和合性を付与することができた。このことは、SP11が花粉側で自己・非自己の認識反



Fig. 3 Schematic maps of the *SP11* transgenes. Npt II, neomycin phosphotransferase gene; OCS3, octopine synthase 3' end; RB and LB, right and left borders of the T-DNA, respectively; H, *Hind*III restriction digest site; B, *Bam*HI site.

応に関与していることを証明している。従って、*SP11*が自家不和合性の花粉側リガンドであろうと結論づけた。

雌しべ側と花粉側の自家不和合性認識物質が分かったことから、Fig. 4に示すような分子機構モデルが推定できた。雄しべで発現した*SP11*タンパク質は花粉表面に付着しており、花粉が雌しべの柱頭細胞に付着したときに*SP11*は柱頭細胞の細胞壁部分に移行する。もし、そこに存在する*SP11*と*SRK*の自家不和合性対立遺伝子番号（S表現型）が一致しているならば、両者は鍵と鍵穴のように結合し、柱頭細胞内のキナーゼドメインのスイッチがオンになる。

おそらく、*SRK*は複数の分子が結合した状態で存在していて、スイッチがオンになると自己リン酸化すると同時に、細胞質に存在する他のタンパク質をリン酸化し、シグナルを伝達するタンパク質群と結合したりしながら”自分の花粉である”というシグナルを柱頭細胞内で伝達し、最終的に花粉管の伸長を阻害する。*SRK*のキナーゼドメインに結合してシグナルを伝達するタンパク質の候補として*ARC1*が、また、結合してシグナル伝達を阻害するタンパク質としてチオレドキシシンなどが知られており、これらを介した細胞内シグナル伝達については今後次々と明らかになると思われる。

#### S多重遺伝子族とS遺伝子座の多様性

上記実験と平行して*SRK*と似た遺伝子（S多重遺伝子族）をゲノム中から探し出し塩基配列の決定や連鎖解析などを行った。その結果、ほとんどのS多重遺伝子族は、S遺伝子座と連鎖しておらず、塩基配列の相同性から計算した得られた系統樹（Fig.5）から、組換えなどによる*SRK*のレセプター部分の多様性への寄与の可能性は低いことが明らかになった。

S遺伝子座のゲノム構造については、パルスフィールド電気泳動を用いたサザンプロット分析に

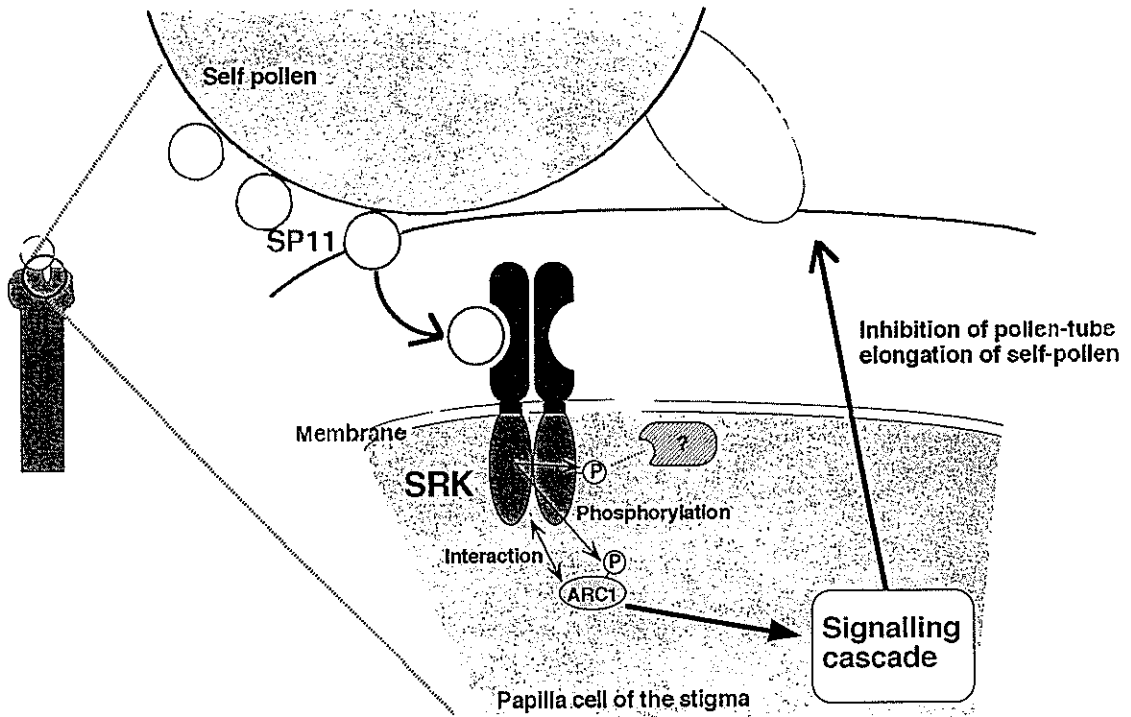
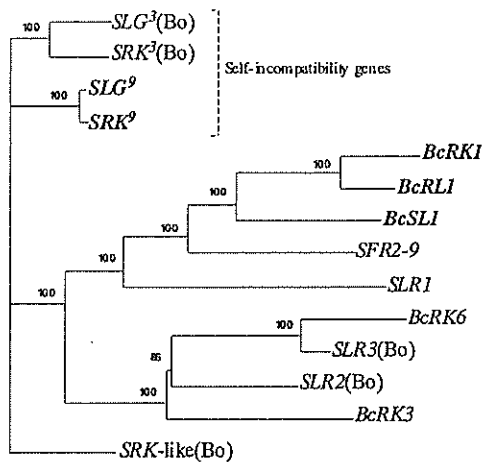


Fig. 4 Molecular model of the SI reaction in *Brassica*.



**Fig. 5** Neighbor-joining tree of the *S*-multigene family. The numbers beside the branches are the boot strap values (%) for 1000 repeats.

より、複数の対立遺伝子間でどの程度構造が違うかを調べた。結果として、*S*遺伝子座上の遺伝子間の距離は対立遺伝子間で様々であることが分かった。同じアブラナ科植物でも、*B. campestris*のほうが*B. oleracea*より変異が少なく、遺伝子間の距離が短いことから、*S*遺伝子座の進化の過程において、*B. oleracea*では様々な配列の挿入が起きたことが明らかになった。

### 3. 研究成果

本研究により、アブラナ科植物の自己・非自己を認識する花粉側リガンドを同定し、自家不和合性との関連を証明することができた。雌しべ側と花粉側の認識物質が明らかになったことから、自家不和合性の分子機構を推定することができた。また、*S*遺伝子や*S*遺伝子座の多様性を明らかにした。

### 4. 今後の課題と発展

今後は、SP11がSRKと実際に対立遺伝子特異的に結合するのかを明らかにするために、リガンドとレセプターの相互作用の研究が必要である。将来的には、SP11とSRKを遺伝子導入することにより、強い自家不和合性を付与したアブラナ科野菜を作成するなどの実用化が望まれる。

### 5. 発表論文リスト

1. Suzuki, G., Watanabe, M. and Nishio, T. (2000) Physical distances between *S*-locus genes in various *S* haplotypes of *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theor.*

*Appl. Genet.* 101: 80-85.

2. Watanabe, M., Ito, A., Takada, Y., Ninomiya, C., Kakizaki, T., Takahata, Y., Hatakeyama, K., Hinata, K., Suzuki, G., Takasaki, T., Satta, S., Shiba, H., Takayama, S. and Isogai, A. (2000) Highly diverged sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in the class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *FEBS Lett.* 473: 139-144.

3. Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., 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*. *Plant Physiol.* 125: 2095-2103.

4. Kai, N., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (2001) Sequence comparisons among dispersed members of the *Brassica S* multigene family in an *S9* genome. *Mol. Genet. Genomics* 265: 526-534.

5. Hatakeyama, K., Takasaki, T., Suzuki, G., Nishio, T., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (2001) The *S* receptor kinase gene of *Brassica* determines dominance relationships between *S* haplotypes of the stigma. *Plant J.* 26: 69-76.