



Title	Structure and Function of Rosaceous S-RNase Associated with Gametophytic Self-Incompatibility
Author(s)	Ishimizu, Takeshi
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3143757">https://doi.org/10.11501/3143757</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	石水	いし みず	毅	たけし
博士の専攻分野の名称	博士(理学)			
学位記番号	第 13643 号			
学位授与年月日	平成10年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科有機化学専攻			
学位論文名	Structure and function of rosaceous S-RNase associated with gametophytic self-incompatibility (配偶体型自家不和合性に関するバラ科 S-RNaseの構造と機能)			
論文審査委員	(主査) 教授 相本 三郎			
	(副査) 教授 長谷 純宏 助教授 乗岡 茂巳			

### 論文内容の要旨

頤花植物の多くは自他の花粉を認識して非自己花粉により受精が行われる自家不和合性を有している。この性質は近親交配を避けることにより集団内の遺伝的多様性を高め、種の維持に役立っていると考えられている。この現象は一遺伝子座の複対立遺伝子であるS遺伝子座によって支配されている。バラ科の自家不和合性は配偶体型に分類され、半数体の花粉のS遺伝子型が二倍体のめしべのS遺伝子型の一方と一致するとき、花粉管の伸長が花柱内で阻害され受精が行われない(図1)。近年、配偶体型自家不和合性を示すナス科、ケン科において、めしべに発現しているS遺伝子産物としてそれぞれRNase、機能未知の糖タンパク質が同定された。バラ科ではめしべ側のS遺伝子産物がRNaseであるということを示唆するデータが報告されてるが、これまでS-RNaseがどのように自他の花粉の識別にかかわっているのかについてはほとんど理解が得られていない。

本研究では、まずバラ科ニホンナシのめしべ側S遺伝子産物を2次元電気流動により同定し、このタンパク質がRNase活性をもっていることを確認した(以後、S-RNaseとする)。次に翻訳後修飾を含めたS-RNaseの化学構造を詳細に決定し、得られた構造的特徴を基にしてS-RNaseが自他の花粉の識別にどのように関わっているのか考察した。

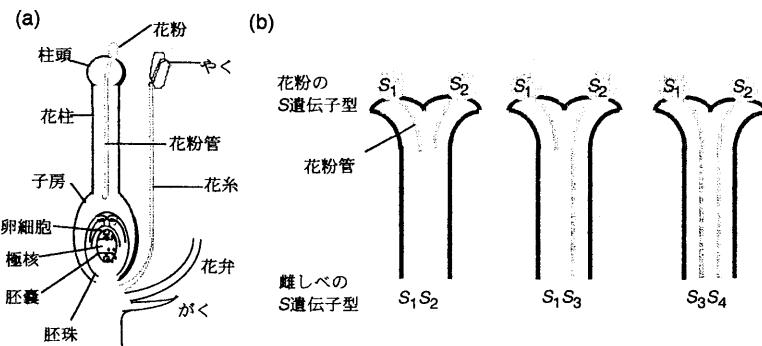


図1：(a)花の構造。花粉管が胚珠の卵細胞まで伸び、受精が行われる。(b)配偶体型自家不和合性。S遺伝子によって制御される。半数体の花粉のS遺伝子型が二倍体の雌しべのS遺伝子型の一方と一致するとき、花粉管の伸長が花柱内で阻害され、受精が行われない。

遺伝学的に7種類のS遺伝子型 ( $S_1 \sim S_7$ ) が同定されているニホンナシ(バラ科)を用いて2次元電気泳動によりめしべ側S遺伝子産物の検索を行い、S遺伝子型に対応する分子量約30kDの塩基性タンパク質を同定した(図2)。このタンパク質はRNase活性を有していたのでS-RNaseとした。S-RNaseは自家不和合性を獲得する時期に特異的に発現していた。「二十世紀」( $S_2S_4$ )の自家和合性変異体である「おさ二十世紀」( $S_2S_4^{sm}$ ) (めしべ側の $S_4$ 遺伝子型の表現がみられない)では $S_4$ -RNaseの発現がみられず、その後代の自家和合性品種でも $S_4$ -RNaseが発現していなかった。これらの結果から、ナス科と同様にバラ科のニホンナシの自家不和合性もS-RNaseが関与していることが明らかになった。

次に7種類のS-RNaseのアミノ酸配列分析、cDNAの塩基配列分析を行い、全一次構造を決定した(図3)。RNase活性に必要な残基を含む91残基が保存残基、および約15残基からなるアミノ酸置換が頻繁にみられる超可変(HV)領域が見い出された。HV領域はS遺伝子型特異性に関与していると考えられた。またバラ科の各S-RNase間の相同性は60~70%程度であるが $S_3$ -と $S_5$ -RNase、 $S_1$ -と $S_4$ -RNaseの相同性は95.5%、90.0%にも達し、特に $S_3$ -と $S_5$ -RNaseの組ではアミノ酸置換部位はHV領域を含むN端側の70残基からなる領域に限られていた(図4)。 $S_3$ -と $S_5$ -RNaseのHV領域を含むこの限られた領域は、 $S_3$ および $S_5$ の花粉を識別するのに重要な役割を果たしていると考えられた。

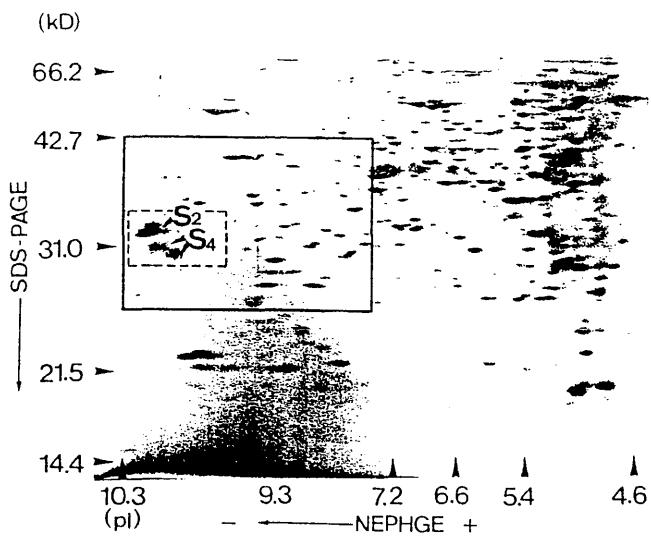


図2：2次元電気泳動による花柱タンパク質の分離。二十世紀( $S_2S_4$ )の花柱抽出物を分離した例。14品種について同様の分析を行い、S遺伝子型に対応して現れる分子量約3万の塩基性タンパク質を同定した。これらを精製したところRNase活性を示した。

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
S1	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTALNSQKIGNM-TAQLEIIWPVNVLRSRSDHVGFWEREWIKHGTCG-YPT									
S2	ARYDVFQFTQQYQPAFCNSNPTCCKDPFDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEYCY-EIQLEIIWPVNDSRKAHRGFWRKQMYKHGSCA-SPA									
S3	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCCKDPFDKLFTVHGLWPSNRNGPDPESKC-PIKNIRKREKLLIEQLEIIWPVNDFDRTKNNLFWDKEWYKHGSCG-YPT									
S4	FDVFQFTQQYQPAVCNSNPTCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTNSQKIGNM-TAQLEIIWPVNVLRSRSDHVGFWEREWIKHGTCG-YPT									
S5	YDYFQFTQQYQOLAVCNSNRTCPCKDPFDKLFTVHGLWPSNSMAGPDPNSC-PIRNIRKREKLLIEQLEIIWPVNDFDRTKNNLFWDKEWYKHGSCG-YPT									
S6	YNYFQFTQQYQPAVCNSNPTCNDPTDKLFTVHGLWPSNDVGDDPIYCKNNTIKSQQIGNL-TQLEIIWPVNVLDRTBHVGFWHRQNNKHGSCGKAPT									
S7	YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTCNDPTDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTNSQKIGNM-TQLEIIWPVNVLRSRSDHVGFWEREWIKHGTCG-YPT									
HV										
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
S1	IKKDDMHYLQTIVRNYITQKQWNSAILSAAZCOPNGTNRPLVDEINAIIRRGTNNTRPKFKCQKNTRTTEFLVEVTLCSDRDLKKF1NC-PNGPPQGSRFSCPSS-VQY									
S2	LPNQKMHYFETVIRMFILAEKQNVSRLSMMATIEPEGKGNRNLLEIQNIAPIAGTNNNMPKLKCQKVN-GHIELVEVTLCHDSNLTCQF1NCPRPLPQASPYFCPIIDQY									
S3	IDENENHYFETVIMMYISKKQWNSRLSAAKIEPDGKXRAALLDZENAINRGADNKKPKLKCQKG-TTEFLVEVTLCSDRDLTKF1NC-PNGPPKGSRYFPCPAN-VKY									
S4	IKDDMHYLQTIVRNYITQKQWNSAILSAAZCOPNGTNRPLVDEINAIIRSNNNTPKFKCQKNTRTTEFLVEVTLCSDRDLTKF1NC-PNGPPKGSRYFPCPAN-VKY									
S5	IDENENHYFETVIMY15KKQWNSRLSAAKIEPDGKXRAALLDZENAINPGADNKKPKLKCQKG-TTEFLVEVTLCSDRDLTKF1NC-PNGPPKGSRYFPCPAN-VKY									
S6	IKDEMTHYFYTIVRNYITQKQWSEILSRANTEPEGKXRAALLDZENAINA1RLGTKDQKPKPLKCQKNN-OTTEFLVEVTLCSDRDLTKF1DC-PSSSFKGSPPFHCPCTNHILY									
S7	IHMDDTHYFQTIVRNYITQKQWSEILSKAKIEPLGIORPLVHIEINAPNSTNNKPKFRCQKNS-GVTELVETVGLCSQGSLTGFRCNCPHPPP-QSPYLCPAD-VKY									

図3：7種類のニホンナシのS-RNaseの一次構造。保存残基に影をつけた。保存残基が連続して存在しない領域を超可変(HV)領域とした。

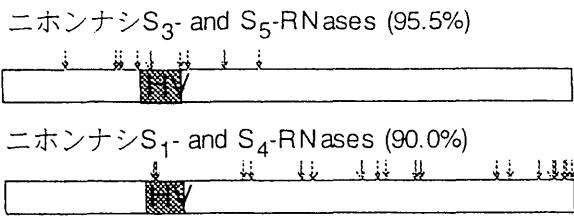


図4：高いホモロジーのあるS-RNase間のアミノ酸置換部位。HV領域を影で、アミノ酸置換部位を矢印で示した。

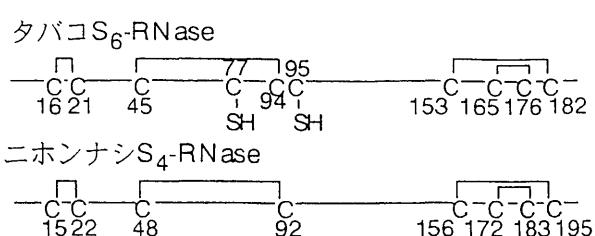


図5：S-RNaseのシステイン残基の存在状態とS-S結合位置。

次に、新たに考案した遊離チオール基の酸性条件下でのピリジルエチル化と LC/ESI-MS 分析を組み合わせた方法により S-S 結合の位置を決定した。ナス科のタバコ S<sub>6</sub>-RNase は 2 つの遊離 Cys 残基と 4 組の S-S 結合をもち、バラ科のニホンナシ S<sub>4</sub>-RNase も相同な 4 組の S-S 結合を有していた（図 5）。このうちの 2 組はクモノスカビの RNaseRh と共にあった。S-S 結合をつくる 8 つのシステイン残基はほとんどすべての S-RNase に保存されているので S-RNase の立体構造の形成・維持に役立っていると考えられる。

次に、7 種類のニホンナシ S-RNase の N 配糖体の構造を、ピリジルアミノ化標識、プロテアーゼ消化物の LC/ESI-MS 分析により決定した（図 6）。唯一保存されている糖鎖結合部位 Asn121 には不均一なキシロマンノース型糖鎖が結合しており、各種糖鎖の存在比は S-RNase 間で類似していた。その他の部位には N 配糖体型類鎖としては初めてみいだされたキトビオースおよび N-アセチルグルコサミンのショート型糖鎖、複合体型糖鎖が結合していた。これらの部位は各 S-RNase 間で保存されておらず、またほとんどの部位で糖鎖構造の不均一性がみられた。S-RNase を認識する分子が S-RNase と対応する不均一性をもたないと仮定すると、各糖鎖に共通にある N-アセチルグルコサミンが自他の花粉識別に関与することはできるが、糖鎖全体は関与しないと考えられる。また相同性の高い S<sub>3</sub>-と S<sub>5</sub>-RNase の糖類結合部位、糖鎖構造は類似していたので、両者の糖鎖は S<sub>3</sub> と S<sub>5</sub> 花粉の識別に関与しないと考えられる。

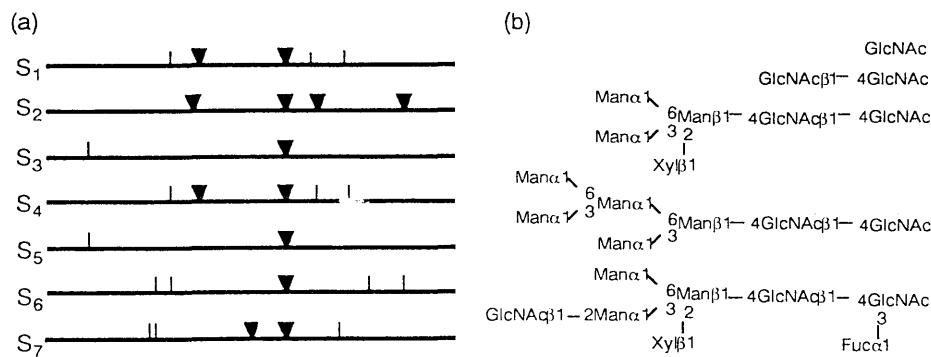


図 6 : (a) ニホンナシ S-RNase の糖鎖結合部位。左側が N 末端である。ショート型糖鎖のみ結合している部位を | でそれ以外のもも結合している部位を ▼ で表した。(b) S-RNase にみられる代表的な糖鎖構造。

S-RNase は正の淘汰がはたらいていると考えられており、それを検証するために 11 種類のバラ科の S-RNase 遺伝子の塩基の同義・非同義置換数 ( $d_s$ ・ $d_n$ ) のウインドウ解析を行った（図 7）。 $d_n$  が  $d_s$  を上回る領域（PS1～PS4 領域）が 4 ケ所存在し、先に同定した HV 領域は PS1 領域に含まれていた。このような領域は脊椎動物の免疫系において自他認識を司る MHC タンパク質の抗原認識領域などのタンパク質の認識に関わる領域の数例のみにみられるものである。S-RNase と相同性があるタンパク質で唯一立体構造が既知の RNaseRh の立体構造上にこれらの PS 領域をあてはめてみると、基質結合クレフトをはさんだ分子の両端の 2 領域に存在した（図 8）。これらのこととは S-RNase の PS 領域がつくる 2 領域が自他認識に関わっている可能性を示している。

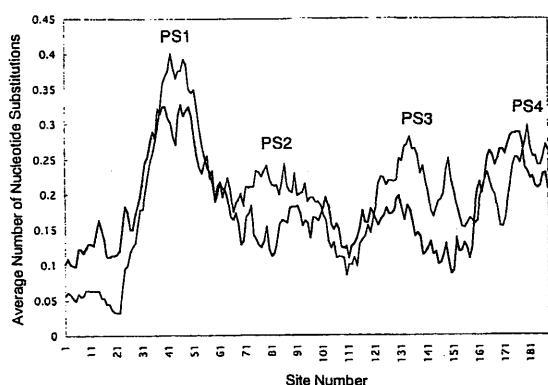


図 7 : バラ科 S-RNase の同義・非同義置換数のウインドウ解析。ウインドウサイズは 20 コドンにした。11 種類の S-RNase の 55 種類の各組み合わせの同義・非同義塩基置換数の平均値をウインドウに対してプロットした。同義置換数は青色で、非同義置換数は赤色で示した。

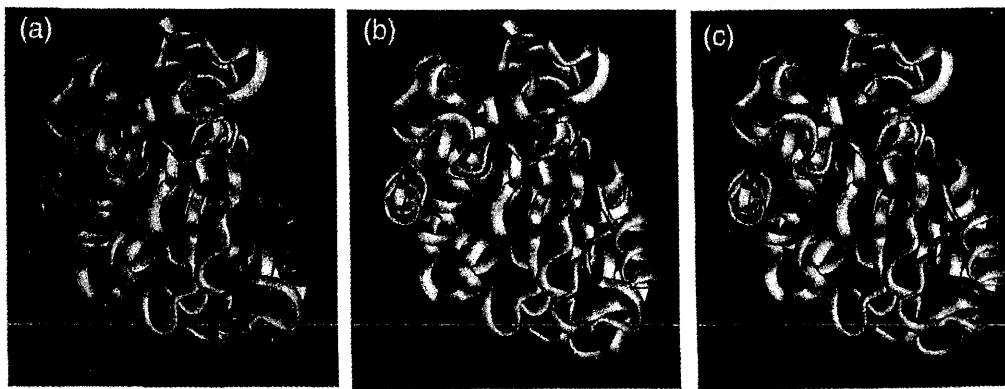


図8 : S-RNase のPS領域と高い相同意を示す S-RNase 間のアミノ酸置換部位の RNaseRhの立体構造上での位置。(a)PS1, PS2, PS3, PS4領域をそれぞれ赤、黄、緑、紫で示した。(b)S<sub>3-</sub>とS<sub>5-</sub>-RNaseの、(c)S<sub>1-</sub>とS<sub>4-</sub>-RNaseのアミノ酸置換部位を赤で示した。

S-RNase の一次構造解析、 $d_N$ と $d_S$ のウインドウ解析の結果から S-RNase の起源について考察した。ごく最近に PS1 あるいは PS2 領域のアミノ酸置換が自他花粉の認識に必要であることが示された。このことは $d_N$ が $d_S$ を上回る PS1 あるいは PS2 領域に正の淘汰（ここでは超優勢淘汰）が働いたことを示すものである。また PS1 領域の $d_S$ は $d_N$ とともに高くなっている。このことはこの領域に遺伝子交換あるいは特別に多いランダムな塩基置換もあったことを示唆している。また S-RNase の系統樹分析ではナシ、リンゴの分岐以前にバラ科の S-RNase の多型性が生じていることが明らかになった。

#### 論文審査の結果の要旨

顯花植物の多くは、近親交配を回避し植物集団内における遺伝的多様性を保持するために、自己と非自己の花粉を認識し非自己花粉でのみ受精する性質をもつ。この性質は自家不和合性と呼ばれ、1遺伝子座（S遺伝子）の複対立遺伝子により支配されている。近年、配偶体型自家不和合性を示すナス科植物の雌しへS遺伝子産物が RNaseT2型のリボヌクレアーゼ（S-RNase）であると実証されたが、S-RNase と相互作用し、自己・非自己を認識する花粉側因子はいまだに発見されず、自家不和合性機構の本質は現在も明らかにされていない。

本研究は、研究が遅れているバラ科配偶体型自家不和合性の分子機構を解明するために、雌しへS遺伝子産物の構造と機能の解析を行ったものである。その結果、バラ科植物の雌しへS遺伝子産物が S-RNaseであることを明らかにし、翻訳後修飾を含めた S-RNase の化学構造を決定し、糖鎖が花粉側因子との認識に関与する可能性が低いことを示した。さらに塩基配列の解析から、非同義置換数が同義置換数を上回り正の淘汰を受けていると考えられる4つの領域を S-RNase 上に見い出し、S-RNase の認識部位との関連が示唆された。このような領域が自家不和合性関連蛋白質に検出されたのは、本研究が初めてである。

以上のように、本研究はバラ科配偶体型自家不和合性の分子的基礎を明確にし、S-RNase の認識部位に関する重要な知見を提示した極めて意義のある研究で、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認定する。