



Title	配偶体型自家不和合性因子ニホンナシS_3-RNaseのX線結晶構造解析
Author(s)	松浦, 孝範
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/27645">https://hdl.handle.net/11094/27645</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

博士論文

配偶体型自家不和合性因子  
ニホンカシ  $S_3$ -RNase の X 線結晶構造解析  
Crystal structure analysis of Japanese peei  
 $S_3$ -RNase responsible for gametophytic  
self-incompatibility

松浦 孝範

大阪大学大学院 理学研究科  
(大阪大学たんばく質研究所 化学構造部門)

2002年2月

博士論文

配偶体型自家不和合性因子  
ニホンナシ  $S_3$ -RNase の X 線結晶構造解析  
Crystal structure analysis of Japanese pear  
 $S_3$ -RNase responsible for gametophytic  
self-incompatibility

松浦 孝範

大阪大学大学院 理学研究科  
(大阪大学たんぱく質研究所 化学構造部門)

2002 年 2 月

# 目次

謝辞	vii
略語一覧	ix
<b>第1章 概要</b>	1
1.1 自家不和合性と <i>S</i> 遺伝子座 . . . . .	1
1.2 胞子体型自家不和合性 . . . . .	2
1.3 配偶体型自家不和合性 . . . . .	2
1.4 S-RNase と RNsae T <sub>2</sub> 型酵素 . . . . .	3
1.5 S-RNase のアミノ酸配列と自他認識部位 . . . . .	4
1.6 S-RNase による rRNA の分解 . . . . .	5
1.7 配偶体型自家不和合性の分子機構 . . . . .	5
1.8 本研究の目的 . . . . .	6
<b>第2章 ニホンナシ (<i>Pyrus pyrifolia</i>) S<sub>3</sub>-RNase の精製と結晶化</b>	13
2.1 概要 . . . . .	13
2.2 実験材料, 方法 . . . . .	14
2.3 結果および考察 . . . . .	15
<b>第3章 配偶体型自家不和合性に関するニホンナシ (<i>Pyrus pyrifolia</i>) 花柱リボヌクレアーゼの 1.5 Å 分解能結晶構造解析</b>	21
3.1 概要 . . . . .	21
3.2 実験材料, 方法 . . . . .	22

3.3	結果	24
3.4	考察	29
第 4 章	ニホンナシ S <sub>3</sub> -RNase と S <sub>5</sub> -RNase の立体構造比較	39
4.1	概要	39
4.2	実験材料, 方法	39
4.3	結果および考察	40
第 5 章	バラ科およびナス科 S-RNase の構造と機能の比較	45
5.1	概要	45
5.2	実験材料, 方法	46
5.3	結果および考察	46
第 6 章	結論	57
参考文献		61
研究成果の発表		71

# 表目次

2.1 X 線回折実験によって得られたニホンナシ $S_3$ -RNase 結晶の統計値 . . . . .	17
3.1 X 線回折実験およびデータの精密化によって得られたニホンナシ $S_3$ -RNase 結晶の統計値 . . . . .	32



# 図目次

1.1	花の構造 . . . . .	7
1.2	配偶体型自家不和合性のしくみ . . . . .	7
1.3	S-RNase による配偶体型自家不和合性の分子モデル . . . . .	8
1.4	RNase Rh において考えられている RNA 分解反応のモデル . . . . .	9
1.5	RNA フラグメント . . . . .	10
1.6	二ホンナシ ( <i>Pyrus pirifolia</i> ) の花 . . . . .	11
2.1	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の精製概略 . . . . .	18
2.2	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の精製各段階のクロマトグラム . . . . .	19
2.3	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の結晶 . . . . .	20
3.1	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の全体像 (ステレオ図) . . . . .	33
3.2	RNase T <sub>2</sub> 型酵素のアミノ酸配列アライメントと二次構造 . . . . .	34
3.3	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase と RNase Rh の活性部位を構成するアミノ酸残基の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図) . . . . .	35
3.4	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の HV, PS 領域の配置 . . . . .	36
3.5	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の HV, PS 領域の立体配置 . . . . .	37
3.6	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase の HV (PS1), PS2 領域 (ステレオ図) . . . . .	37
3.7	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase 各 PS 領域の表面電荷 . . . . .	38
4.1	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase, S <sub>5</sub> -RNase, リンゴ野生種 S <sub>t</sub> -RNases のアミノ酸配列アライメント . . . . .	42
4.2	二ホンナシ S <sub>3</sub> -RNase と S <sub>5</sub> -RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図) .	42

4.3 ニホンナシ $S_3$ -RNase と $S_5$ -RNase の立体構造の重ね合わせ: HV (PS1) 領域 (ステレオ図) . . . . .	43
4.4 ニホンナシ $S_3$ -RNase とリンゴ野生種 $S_t$ -RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図) . . . . .	43
4.5 PS1 (HV), PS2 領域の表面電荷 . . . . .	44
5.1 アミノ酸配列から構築された S-RNase の系統樹 . . . . .	50
5.2 双子葉植物の進化系統樹における自家不和合性の分布 . . . . .	51
5.3 ニホンナシ $S_3$ -RNase とタバコ $S_{F11}$ -RNase の全体構造 . . . . .	52
5.4 ニホンナシ $S_3$ -RNase とタバコ $S_{F11}$ -RNase の活性部位 . . . . .	52
5.5 ニホンナシ $S_3$ -RNase とタバコ $S_{F11}$ -RNase の活性部位を構成するアミノ酸の立体配置 (ステレオ図) . . . . .	53
5.6 ニホンナシ $S_3$ -RNase とタバコ $S_{F11}$ -RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図) . . . . .	54
5.7 バラ科およびナス科 S-RNsae の HV (HV $a$ ), HV $b'$ (HV $b$ ), PS4 領域のアミノ酸配列アライメント . . . . .	55
5.8 PS1 (HV), PS2 領域の表面電荷 . . . . .	56
6.1 Luu らが提唱するモデル . . . . .	60

# 謝辞

本研究の遂行と論文作成にあたり終始御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学たんぱく質研究所化学構造部門の乗岡茂巳助教授に心より感謝の意を表しますとともに、様々な御指導や御助言を賜りました同部門の関口清俊教授、李紹良助手、顧建国助手、乗岡尚子氏に深く感謝致します。また、多くの有益な助言をいただきました瀬崎浩史氏、河本延子氏はじめ同部門の皆様に感謝致します。

ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の結晶化、データ収集、立体構造解析等幅広く御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学たんぱく質研究所物理構造部門の酒井宏明助手（現 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター）、月原富武教授、海野昌喜氏に心より感謝の意を表します。

本研究の実験材料であるニホンナシの花を提供していただきましたとともにニホンナシについてご教授いただきました鳥取県園芸試験場の井上耕介、村田謙司、下中雅仁、田平弘基各氏をはじめとして同試験場の皆様に深く感謝致します。

ニホンナシの採花作業において多大なご協力をいただきましたとともにニホンナシについてご教授いただきました神戸大学農学部果樹科学研究分野の中西テツ教授をはじめとして同研究室の皆様に感謝致します。

放射光施設でのデータ収集に際し御指導いただきました財団法人高輝度光科学研究中心（SPring-8）の三浦圭子氏および高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設（Photon Factory）の五十嵐教之氏、鈴木守氏をはじめとして両施設の皆様に感謝の意を表します。

最後に、私のわがままを聞き入れ研究生活を与えていただいた家族に深く感謝致します。



# 略語一覧

DEPC ジエチルピロ炭酸

$d_N$  非同義置換数

$d_S$  同義置換数

EDTA エチレンジアミン四酢酸

GlcNAc N-アセチルグルコサミン

HIC-Up Hetero-compound Information Centre, Uppsala

LIBRA LLight Balance for Remote Analogous proteins

HV hypervariable

Man マンノース

MES 2-モルホリノエタンスルホン酸

PS positively selected

RNase リボヌクレアーゼ

# 第1章

## 概要

### 1.1 自家不和合性と *S* 遺伝子座

有性生殖は、高等生物にとって種の遺伝的多様性の維持や劣性変異の発現抑制のための機構として極めて重要である。有性生殖を実現するには、異なる系統(親)間で雄性と雌性の配偶子が受精する必要がある。動物は自由に動き回ることができ、一般に雌雄が別個体であることから、異なる系統の配偶子と受精することができる。一方、植物は自由に動き回ることができず、大部分が雌雄両性花であることから、自家受粉による受精の確率が高くなる。しかし、自殖の繰り返しは遺伝的にホモ個体を生み出し、植物集団内の遺伝的多様性を維持できない。そこで、多くの植物は花粉と雌しべの間に自他識別システムを発達させ、自家受精による自殖弱勢を防いでいる[1, 2]。植物におけるこのような仕組みは自家不和合性と呼ばれている。

C. Darwin が彼の著書「種の起源[3]」の中で触れて以来、自家不和合性は多くの研究者の興味を惹き、研究が進められてきた。自家不和合性は、1 遺伝子座(*S* 遺伝子座)の複対立遺伝子により支配され、雌しべ側が和合性になった変異体と花粉側が和合性になった変異体が独立に単離されてきた。このことから、*S* 遺伝子座には雌しべ側で特異的に発現する *S* 遺伝子産物と花粉側で特異的に発現する *S* 遺伝子産物がコードされ[1, 2]、それらの分子間相互作用により自己・非自己が認識されていると考えられている。さらに、自家不和合性は *S* 遺伝子型の遺伝様式の違いから胞子体型と配偶体型に大別されている。

## 1.2 胞子体型自家不和合性

胞子体型自家不和合性は、アブラナ科、ヒルガオ科植物において研究が進められている。胞子体型自家不和合性では、二倍体である花粉親(胞子体)の *S* 遺伝子型がそのまま花粉に受け継がれ(花粉は一倍体であるが 2 種類の *S* 遺伝子型の性質をもつ)、花粉の *S* 遺伝子型の一方が雌しへの 2 種類の *S* 遺伝子型の一方と一致すれば、花粉は発芽しない、あるいは発芽しても柱頭に侵入できない。アブラナ科植物では雌しへ側 *S* 遺伝子産物として SRK (S-Receptor Kinase) と SLG (S-Locus Glycoprotein) が同定されている。花粉側 *S* 遺伝子産物は長らく同定されなかつたが、最近 SP11 蛋白質 (S-locus Protein 11, 別名 SCR: S-locus Cysteine rich protein) が発見され、花粉側 *S* 遺伝子産物と同定された [4, 5]。これらの因子の相互作用により自他認識が行われ、花粉管内に蛋白質のリン酸化シグナルとして情報伝達され、自己花粉の発芽・伸長抑制を引き起こすというモデルが提唱されている [6]。一方、ヒルガオ科サツマイモも胞子体型自家不和合性を示すが、*S* 遺伝子型に連鎖した SRK 様物質は同定されず、同じ胞子体型を示す植物でも、その機構はアブラナ科植物のものとは異なると考えられている。

## 1.3 配偶体型自家不和合性

配偶体型自家不和合性は、バラ科、ナス科、ゴマノハグサ科、ケシ科、イネ科など 15 種類の科で報告されている [7]。配偶体型自家不和合性では、花粉は減数分裂により花粉親の 2 種類の *S* 遺伝子型の一方のみを受け継ぎ、花粉の *S* 遺伝子型が雌しへの 2 種類の *S* 遺伝子型の一方と一致すれば、花粉管伸長が花柱内で停止する(図 1.2)。ナス科タバコ (*Nicotiana alata*)において *S*<sub>2</sub> 遺伝子型をもつ集団の雌しへ花柱に特異的に発現している分子量約 3 万の糖蛋白質が検出され、その cDNA がクローニングされた [8]。崎山らはコウジ菌が細胞外に分泌する加水分解酵素のひとつである RNase T<sub>2</sub> の一次構造を決定し、酵素活性に必須な 2 つのヒスチジン残基周辺のアミノ酸配列が *S*<sub>2</sub> 糖蛋白質にも保存していることを見いだし、この糖蛋白質は RNase であると予測した [9]。この予測は精製した *S*<sub>2</sub> 糖蛋白質に RNase 活性が検出されたことにより実証された [10]。さらに、*S*<sub>1</sub>、

$S_3$ ,  $S_6$ ,  $S_7$  糖蛋白質にも RNase 活性が確認され、タバコ由来の  $S$  糖蛋白質は RNase T<sub>2</sub> 型酵素であることが明らかとなり、S-RNase と呼ばれた。これ以後、ナス科のペチュニア [11, 12], トマト [13], ポテト, バラ科のニホンナシ [14, 15], チュウゴクナシ [16], リンゴ [17, 18, 19], アーモンド [20], サクランボ, ゴマノハグサ科のキンギョソウにおいて、タバコ S-RNase と類似のリボヌクレアーゼが次々と発見された。S-RNase が配偶体型自家不和合性の雌しべ側因子であることは、タバコおよびペチュニアにおいて S-RNase 遺伝子のセンスあるいはアンチセンスを導入した形質転換体が自家不和合性を獲得あるいは喪失することにより、直接的に証明された [21, 22]。さらに、形質転換体実験により S-RNase の RNase 活性が配偶体型自家不和合性に必須であること [23, 24], S-RNase の糖鎖は配偶体型自家不和合性に関与しないこと [25] が明らかにされた。

一方、ケシ科とイネ科の配偶体型自家不和合性についても精力的な研究がなされているが、これらの植物では S-RNase とは全く異なった蛋白質が関与する機構であると分かっているので [26]、本論文では詳しく議論しない。

## 1.4 S-RNase と RNsae T<sub>2</sub> 型酵素

リボヌクレアーゼ (RNase) とは、RNA のホスホジエステル結合を加水分解する酵素の総称であり、ヌクレオチド鎖の 5' または 3' 末端から一つずつヌクレオチドを切断するエキソリボヌクレアーゼと、ヌクレオチド鎖内部を切断するエンドリボヌクレアーゼに大別される。エンドリボヌクレアーゼは 5'-ヌクレオチドを生成するものと 3'-ヌクレオチドを生成するものに分けられ、後者は 2,3-環状ヌクレオチドを反応中間体として経由するため (図 1.4)、2',3'-環状化リボヌクレアーゼと呼ばれている。2',3'-環状化リボヌクレアーゼはさらに分子量やアミノ酸配列によって、ピリミジンを特異的に切断する RNase A ファミリー、グアニンを優先的に切断する RNase T<sub>1</sub> ファミリー、特別な塩基特異性を有しない RNsae T<sub>2</sub> ファミリーに分類される [27]。S-RNase が分類される RNsae T<sub>2</sub> 型酵素は分子量が約 30,000, 酵素活性の至適 pH が 4–5 である。微生物由来の RNsae T<sub>2</sub> 型酵素と S-RNase 間のアミノ酸配列の相同性は平均 10% 程度と低い。しかし、活性に必須とされている 2 か所の His 残基近傍のアミノ酸配列は非常によく一致している。この相同配列に

基づいてタバコ  $S_2$  糖蛋白質がリボヌクレアーゼであると予測されたのは、先に述べたとおりである。

## 1.5 S-RNase のアミノ酸配列と自他認識部位

ナス科、バラ科、ゴマノハグサ科植物で同定されている S-RNase は約 200 残基からなる RNase T<sub>2</sub> 型酵素である。全体のアミノ酸配列の相同性はナス科とバラ科では 30 % 以下であるが、触媒部位を構成する 2 か所のヒスチジン近傍に、FTXH\*GLWP および KH\*GXC (H\*: 触媒部位ヒスチジン) という共通なアミノ酸配列を有しているのが特徴である ([28], 図 3.4)。アミノ酸配列を詳細に比較すると、*S* 遺伝子型に対応してアミノ酸配列が著しく変動する領域が存在しする (図 3.4)。この領域は HV (hypervariable) 領域と呼ばれ、*S* 遺伝子型の識別に関与すると考えられている [29]。ナス科植物では HV 領域が 2 か所見いだされ、N 末端側より順に HV<sub>a</sub>, HV<sub>b</sub> と呼ばれている。両 HV 領域がナス科の配偶体型自家不和合性における *S* 遺伝子型識別に関与していることは、ポテト (*Solanum chacoense*)  $S_{11}$ -RNase の HV<sub>a</sub> 領域や HV<sub>b</sub> 領域を  $S_{13}$ -RNase のものに入れ替えることで *S* 遺伝子型特異性を  $S_{11}$  から  $S_{13}$  に改変できたこと [30] や  $S_{11}$ -RNase の HV<sub>a</sub> 領域や HV<sub>b</sub> 領域に部位特異的変異を導入することで  $S_{11}$  と  $S_{13}$  双方の *S* 遺伝子型特異性を有する新たな S-RNase を作成できたこと [31] によって証明された。一方、バラ科 S-RNase ではナス科 S-RNase の HV<sub>a</sub> 領域に相当する 1 か所の HV 領域しか検出されておらず [15, 32]、HV<sub>b</sub> 相当領域は欠落していると考えられる (第 3 章、第 4 章, [32, 28])。

一方、遺伝子の塩基配列から認識部位を予測する方法のひとつである同義・非同義置換分析がバラ科 S-RNase に対して行なわれた [33]。類似の蛋白質をコードしている遺伝子間において、アミノ酸置換が起これば蛋白質が機能を失う確率が高いため、一般的に同義置換数 ( $d_S$ ) が非同義置換数 ( $d_N$ ) を上回る。これに対して、蛋白質の認識部位は積極的にアミノ酸変異を起こすほうが自然淘汰に有利に働くため非同義置換数が多くなり、時には同義置換数を越える場合がある。このような領域は正の淘汰を受けていると言われている。蛋白質の認識部位が  $d_N > d_S$  の値を示し正の淘汰を受けていると考えられる例として、MHC クラス I および II [34, 35, 36], マラリア細胞表面タンパク質 MSA2 [36] などが

知られている。11種類のバラ科 S-RNase 遺伝子に対して同義・非同義置換数を解析したところ、非同義置換数が分子全体に渡り非常に高い値を示し、4か所で同義置換数を越えていた (PS1-PS4 領域) (図 3.4)。HV 領域は PS1 領域に含まれる。ナス科 S-RNase の同義・非同義置換分析も Kao らにより行われたが、バラ科に見られるような PS 領域はナス科 S-RNase には見い出されなかった。これらの知見を総合すると、塩基配列やアミノ酸配列から予測される花粉側 S 遺伝子産物に対する認識部位の候補として、ナス科 S-RNase では HVa および HVb 領域、バラ科 S-RNase では HV および PS 領域を挙げることができる。

## 1.6 S-RNase による rRNA の分解

McClure らは、タバコにおいて不和合により伸長停止した花粉管の rRNA は分解されるが、和合の受粉ではこのような分解が起こらないことを示した [37]。この結果と花粉管伸長時に rRNA の合成が起こらないという事実 [38, 39] から、S-RNase が花粉管内に侵入し、rRNA を分解することで花粉管の伸長停止を引き起こす、という rRNA 分解説が提唱された。しかし、「rRNA の分解が不和合性反応の原因か結果か」は定かでなく、S-RNase との自他認識に関する花粉側 S 遺伝子産物が未だに発見されないため、「S-RNase がいかにして自己・非自己の花粉管を認識できるのか」も大きな謎である。

## 1.7 配偶体型自家不和合性の分子機構

花粉側 S 遺伝子産物が未知の状態であるが、多くの状況証拠から配偶体型自家不和合性のモデルとしてレセプター説とインヒビター説が提唱されている (図 1.3, [29, 40])。レセプター説では、花粉側 S 遺伝子産物が花粉管膜に局在する S-RNase のレセプターで、同じ S 遺伝子型の S-RNase のみ花粉管内に取り込むことができるため、自己の花粉管のみ伸長が停止する。一方、インヒビター説では、花粉 S 遺伝子産物が S-RNase の酵素活性を阻害するインヒビターで、S 遺伝子型に関係なく花粉管内に侵入してくる S-RNase のうち、S 遺伝子型が異なるすべての S-RNase の活性が阻害され、自己と同じ S 遺伝子型の花粉管のみ伸長が停止する [29]。

Golz らは、タバコにおいて *S* 遺伝子座を含む染色体断片が核内に重複し 2 種類の *S* 遺伝子型をもつ花粉を產生する変異体を見つけ、この変異体の花粉がすべての *S* 遺伝子型に対して和合になることを見い出した [41]。また、四倍体トマトやペチュニアが和合であるという報告もある [42, 43]。インヒビター説では花粉管内に *S* 遺伝子型の異なる 2 種類のインヒビターが存在することになり、これらの現象を容易に説明できる。レセプター説でもレセプターがホモ多量体で機能を発揮し、ヘテロ多量体では機能しないと仮定すると説明可能である。一方、McCubbin らは RNase 活性のない変異体 S-RNase が優性ネガティブに働くことを報告した [24]。この効果はインヒビター説では理解しがたく、レセプター説によってのみ説明が可能であるため、レセプター説のほうがやや有利のように思われる。しかし、最近 S-RNase が *S* 遺伝子型非特異的に花粉管内に侵入し蓄積することが免疫細胞化学的に明らかにされた [44]。この報告は、インヒビター説を支持するものである。いづれにしても、花粉側 *S* 遺伝子産物が発見されていない現状では、レセプター説、インヒビター説とともに推測の域を出ない。

## 1.8 本研究の目的

本研究では、配偶体型自家不和合性に示すバラ科ニホンナシ S-RNase の立体構造を決定し、今まで一次構造を基に議論されてきた S-RNase の酵素活性、認識部位、花粉側 *S* 遺伝子産物、バラ科配偶体型自家不和合性の分子機構について（上述）、立体構造に基づく構造生物学的視点から議論することが目的である。S-RNase の立体構造に関する報告は今までになく、本研究は世界で最初の成果である。

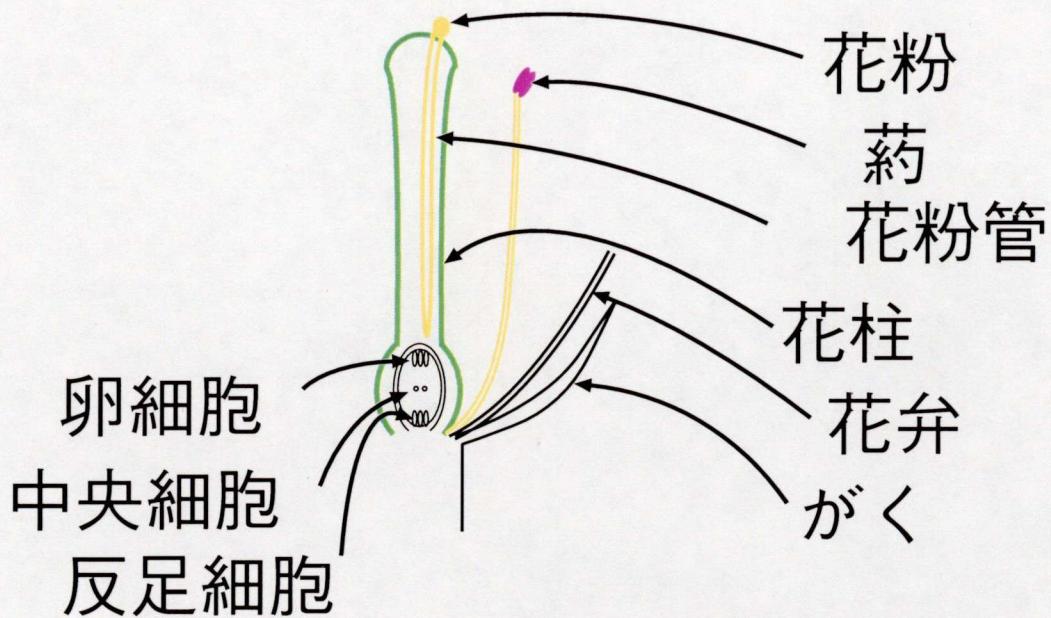


図 1.1: 花の構造

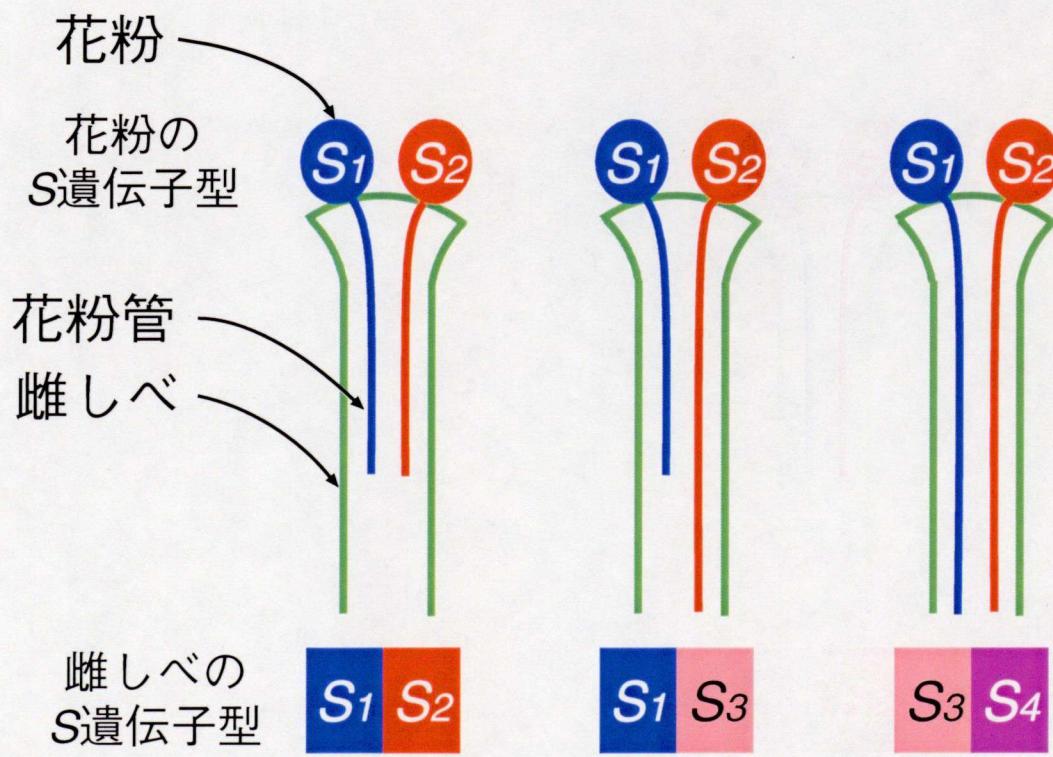


図 1.2: 配偶体型自家不和合性のしくみ

配偶体型自家不和合性は、多型を有する  $S$  遺伝子座によって支配されている。一倍体である花粉の  $S$  遺伝子型が、二倍体である雌しべの  $S$  遺伝子型の一方と一致すると、花粉管伸長が花柱内で阻害され受精できない。

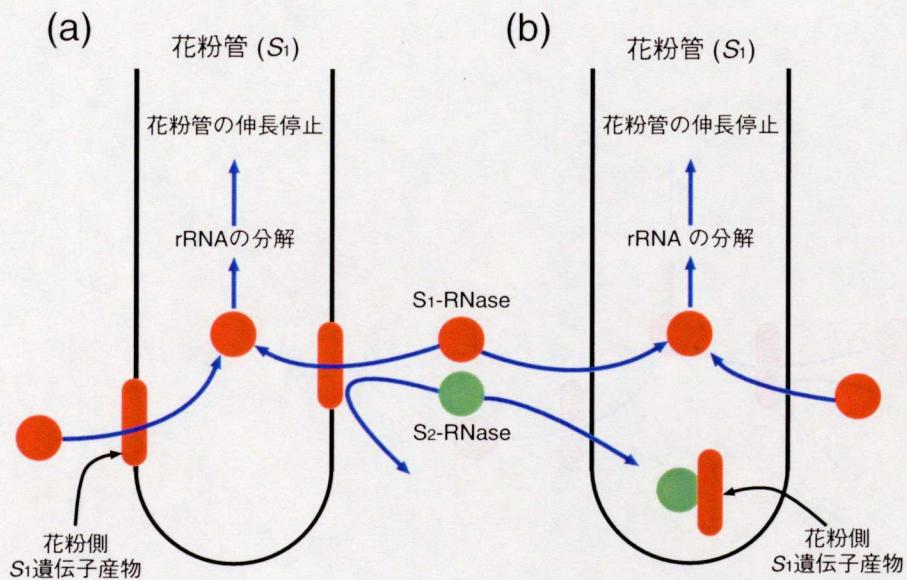


図 1.3: S-RNase による配偶体型自家不和合性の分子モデル

$S_1$  遺伝子型の花粉管が  $S_1S_2$  遺伝子型の雌しべの transmitting tissue を伸長する場合を例示した。(a) レセプター説。この説では花粉側  $S$  遺伝子産物は S-RNase 受容体である。花粉の  $S$  遺伝子型と一致する S-RNsae が花粉管内に取り込まれる。(b) インヒビター説。この説では花粉側  $S$  遺伝子産物は S-RNase インヒビターである。花粉の  $S$  遺伝子型と一致しない S-RNsae が花粉管内で RNase 活性を阻害される。

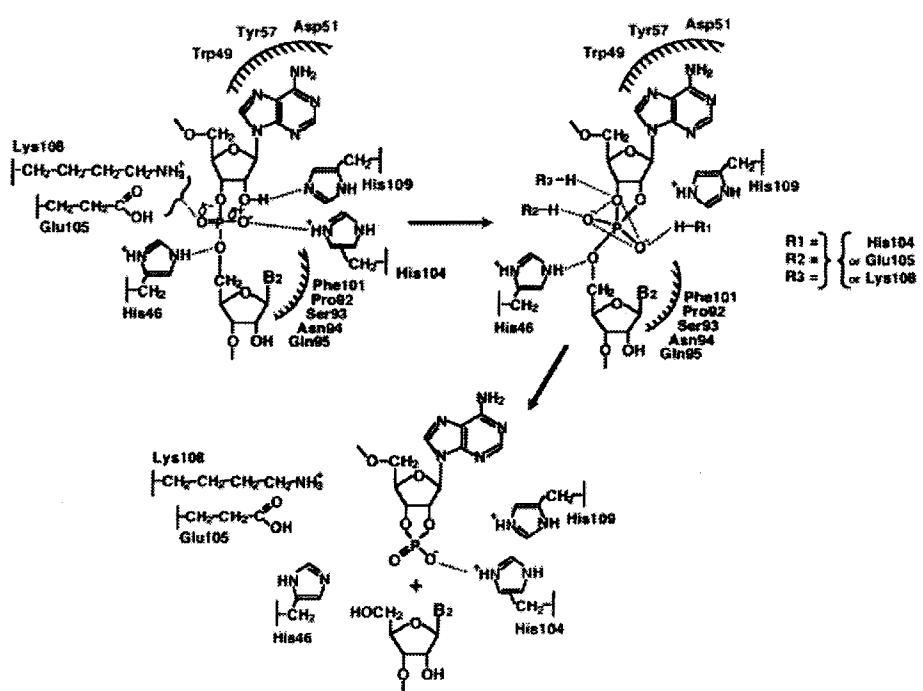


図 1.4: RNase Rh において考えられている RNA 分解反応のモデル  
R1, R2, R3 は、His<sup>104</sup>, Glu<sup>105</sup>, Lys<sup>108</sup> のいずれかを示す。[27] から引用。

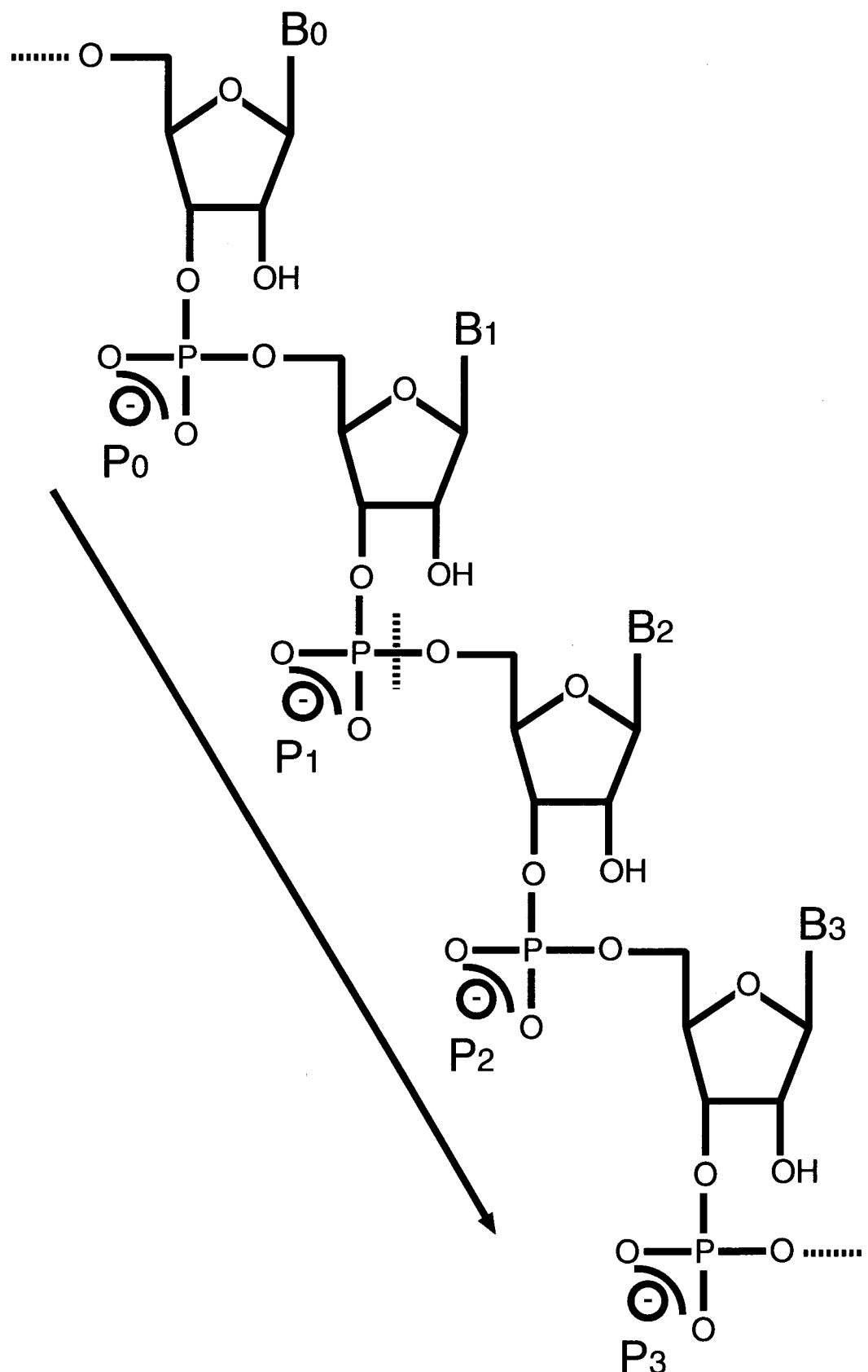


図 1.5: RNA フラグメント



図 1.6: ニホンナシ (*Pyrus pirifolia*) の花



## 第2章

# ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) S<sub>3</sub>-RNase の精製と結晶化

### 2.1 概要

S-RNase による配偶体型自家不和合性の分子機構を明らかにする上で、S-RNase の立体構造情報はきわめて重要であると考えられる。立体構造が明らかになることで、これまで一次構造のみで議論されてきた花粉側 *S* 遺伝子産物に対する認識部位や自他認識機構について構造生物学的視点から議論することが可能となる。また、HV, PS 領域の立体配置や分子表面の性質に関する情報は、現在のところ発見されていない花粉側 *S* 遺伝子産物を検索するための戦略を考える上で非常に有用である。

本研究の対象であるニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) S-RNase では 7 種類の多型 (S<sub>1</sub>–S<sub>7</sub>-RNase) が存在することが知られており [45, 15]、この中から最初に立体構造を明らかにする対象として S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase を選択した。これら S-RNase は糖鎖結合部位が 2 か所とニホンナシ S-RNase の中で最も少なく [46]、比較的結晶を得ることができる可能性が高いと考えられたためである。また、これら S-RNase のアミノ酸配列の相同性は 95.5% と非常に高いにもかかわらず互いを非自己と認識しているためである。両者の立体構造を明らかにし立体構造の際を詳細に比較することで、花粉側 *S* 遺伝子産物の認識に関わる部位を特定し、認識機構について何らかの知見が得られると考えられる。

本章では、立体構造解析の第一歩としてニホンナシ「長十郎 (S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>)」S<sub>3</sub>-RNase の精製、結晶化、SPring-8 BL40B2 ビームラインで行った X 線回折実験について記述する。

## 2.2 実験材料, 方法

### 2.2.1 実験材料

ニホンナシ (*Pyrus pirifolia*) 「長十郎 ( $S_2S_3$ )」の花は、鳥取県園芸試験場 (鳥取県大栄町) から採花した。 $S$  遺伝子型は交配実験により同定されている [47]。成熟しているが花びらが完全には開いていないバルーン状態から花びらが完全に開いている状態 (ただし開薬していない) の花を採集した。採集した花から直ちに雌しべ (柱頭を含む花柱) を切りとりドライアイスで凍結させ、使用直前まで  $-170^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2.2.2 RNase 活性測定

1.5ml マイクロチューブに 0.1M 塩化カリウムを含む 0.2M イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を  $250\mu\text{l}$ , 0.2% DEPC を含む水 (DEPC 処理水) に懸濁した酵母由来 tRNA を  $x\mu\text{l}$  (2mg RNA 相当量), DEPC 処理水を  $(250 - x)\mu\text{l}$  加えて攪拌し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 10 分間放置した。このチューブに蛋白質溶液を  $10\mu\text{l}$  加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間放置した後、 $100\mu\text{l}$  の反応停止液 (25% 過塩素酸, 2% (w/v) 酢酸ランタン水溶液) を加えて 30 分間氷冷した。チューブを  $4^{\circ}\text{C}$  で 15,000rpm, 10 分間遠心し、上清  $20\mu\text{l}$  を DEPC 処理水で 1ml に希釈した後、 $260\text{nm}$  の吸光度を測定した。

### 2.2.3 精製

ニホンナシ  $S_3$ -RNase は、図 2.1 に示した手順で精製した。

### 2.2.4 結晶化と X 線回折データの収集

ニホンナシ  $S_3$ -RNase の結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法により作成した。シリコンコーティングしたカバーガラスに 100 mM MES-水酸化ナトリウム pH 7.0, 200 mM 酢酸ナトリウム, 30% (w/v) PEG 6000 という組成の結晶化溶液  $2\mu\text{l}$  をのせ、第 2.2.3 節で得たニホンナシ  $S_3$ -RNase 溶液  $2\mu\text{l}$  を加えてハンギングドロップを作製した。24 穴タイタープレートに結晶化溶液  $300\mu\text{l}$  を加え、穴の周囲にシリコングリースを塗布した後、液滴を

のせた面がタイタープレートの液面に向くようにカバーガラスで密閉した。この状態で 20°C, 5 日程度静置すると、液滴内に S<sub>3</sub>-RNase 結晶が生じた(図 2.3)。結晶の大きさは約 0.1 × 0.1 × 0.03 mm であった。

結晶をナイロンループでくい取り、直ちに 100K の窒素ガス中に置いた。X 線回折データは SPring-8(兵庫県佐用郡三日月町) BL40B2 ビームラインで X 線検出器 R-AXIS IV(理学電機)を用いて収集した。波長は 0.9Å, カメラ長は 200.0mm, 振動角は 2.0°, X 線照射時間は 40 秒の条件で 83 枚の回折像を得た。プログラム DENZO [48] を用いて空間群を決定し、プログラム SCALEPACK [48] を用いて 1.5Å までのデータを統合した。

## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 精製

ニホンナシ「長十郎」の雌しべ 5,000 花相当分を液体窒素下乳鉢と乳棒で粉状になるまで磨碎し液体窒素を完全に気化させた。5mM EDTA, 15mg/ml L-アスコルビン酸ナトリウム, 30mg/ml polyclar AT(ポリビニルピロリドン, GAF Chemicals Co.)を含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 100ml に試料を加え、4°C で 30 分間攪拌し可溶性蛋白質を抽出した。以下、各クロマトグラフィー画分の分析操作を除いた全ての操作を 4°C で行った。抽出液を 18,800×g, 10 分間遠心し、上清を除いた後沈殿を 5mM EDTA, 15mg/ml L-アスコルビン酸ナトリウムを含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 50ml に懸濁し 18,800×g, 10 分間遠心した。さらに上清を除き沈殿を 5mM EDTA, 15mg/ml L-アスコルビン酸ナトリウムを含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 50ml に懸濁し 18,800×g, 10 分間遠心した。各遠心で得られた上清は一つにまとめた。まとめた上清に硫酸アンモニウムを 90%飽和となるように加えて攪拌して硫酸アンモニウムを完全に溶解した後、2 時間放置した。この溶液を 24,300×g, 60 分間遠心し、沈殿を 5mM EDTA, 15mg/ml L-アスコルビン酸ナトリウムを含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 少量(約 20ml)に懸濁し、5mM EDTA を含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 6.5)で平衡化した Sephadex G-75 superfine カラムによるゲルろ過に供した。280nm の吸光度および RNase 活性を測定し RNase 活性を有する画分を

集め、5mM EDTA を含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した CM-cellulose カラムに供した。吸着物は 0–0.4M 塩化ナトリウムを含む 40mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) による直線濃度勾配により溶出した。280nm の吸光度および SDS-PAGE により S-RNase 画分を決定して集め、10mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) 31 に透析した。透析外液を 1 回交換し再度透析した後、10mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに供した。吸着物は 10–250mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) による直線濃度勾配により溶出した。280nm の吸光度および SDS-PAGE により S-RNase 画分を決定して集めた。ニホンナシ  $S_3$ -RNase 濃度が 4mg/ml となるように濃縮し、外液を 0.1M MES-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に置換して、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の最終標品とした。

### 2.3.2 結晶化と X 線回折データの収集

1 個の結晶を用いて 1.5Å 分解能のデータを得た。得られたデータの詳細な統計値は表 2.1 のとおりである。プログラム *DENZO* [48] によるデータ処理とプログラム *HKLVIEW* [49] により作成された pseudo-precession 写真により空間群は  $P2_1$ , 単位格子は  $a = 45.4$ ,  $b = 52.4$ ,  $c = 47.4$  Å,  $\alpha = \gamma = 90$ ,  $\beta = 106.5^\circ$  と決定した。非対称単位にニホンナシ  $S_3$ -RNase (分子量約 25,000) が 1 分子存在すると仮定すると、Matthews 係数  $V_m$  [50] は 2.16Å<sup>3</sup>/Da であった。この値から概算される溶液含有率は 43% であった。

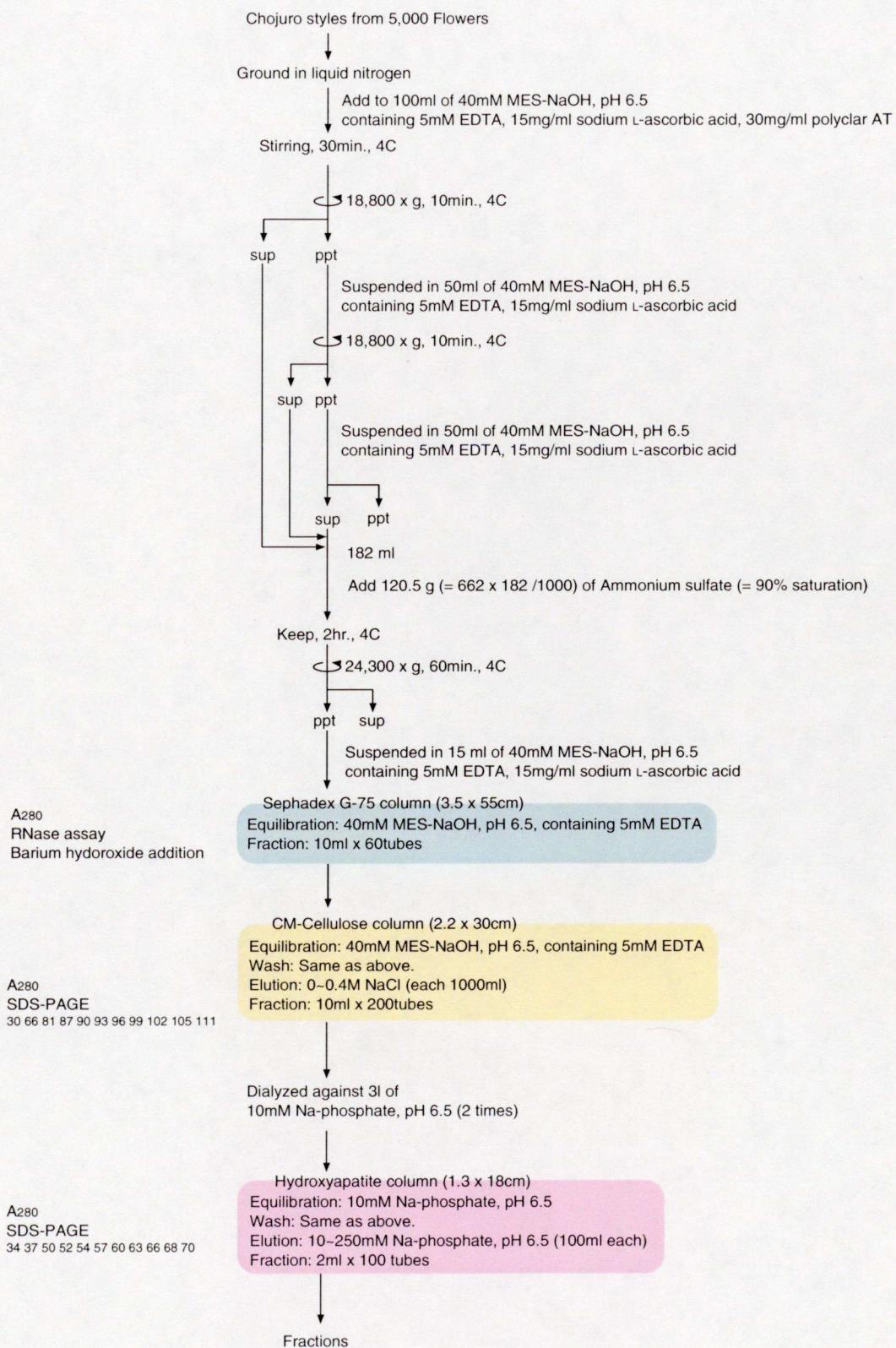
表 2.1: X 線回折実験によって得られたニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase 結晶の統計値

Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters <sup>*a</sup>	
<i>a</i> (Å)	45.39(6)
<i>b</i> (Å)	52.40(5)
<i>c</i> (Å)	47.41(6)
$\alpha, \gamma$ (°)	90.00
$\beta$ (°)	106.60(6)
Resolution <sup>*b</sup> (Å)	1.5 (1.53–1.5)
Observed reflections	105257 (5999)
Independent reflections	33441 (2095)
$R_{\text{merge}}$ <sup>*c</sup> (%)	5.7 (14.6)
Completeness (%)	96.3 (90.6)
$I/\sigma(I)$	14.7 (11.3)
Averaged redundancy	3.2 (2.6)

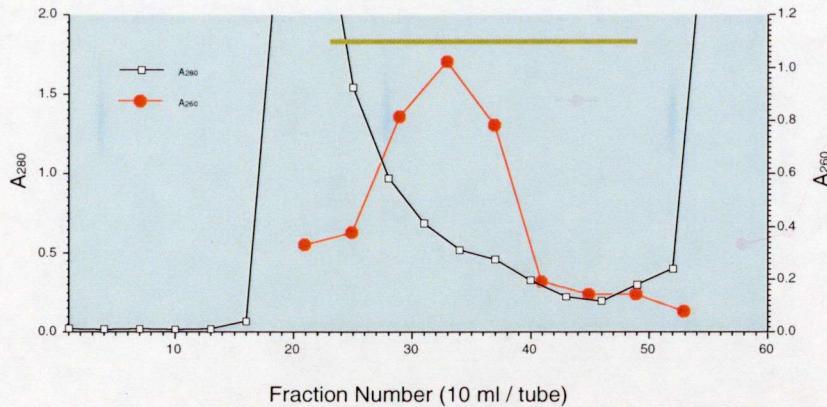
<sup>\*a</sup> Values in parenthesis are estimated standard deviations.

<sup>\*b</sup> Values in parenthesis are in the highest resolution shell in 1.53–1.5 Å.

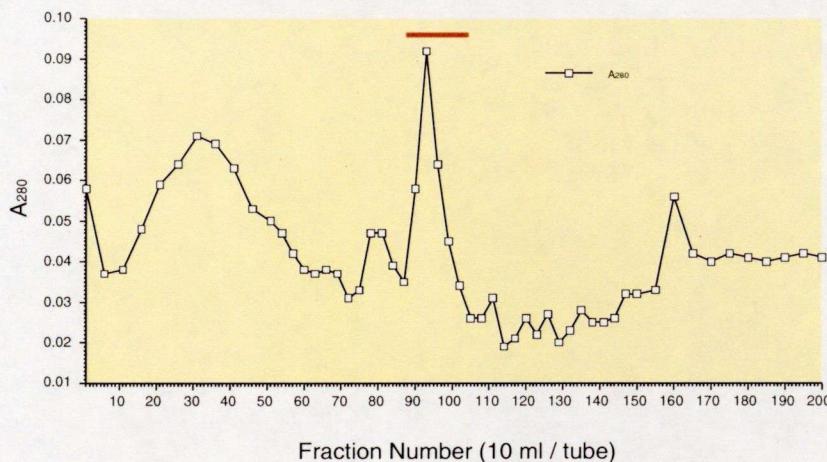
<sup>\*c</sup>  $R_{\text{merge}} = (\sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i) \times 100$ , where  $I_i$  is an individual intensity observation,  $\langle I \rangle$  is the mean intensity for that reflection and the summation is over all reflections.

図 2.1: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の精製概略

(a)



(b)



(c)

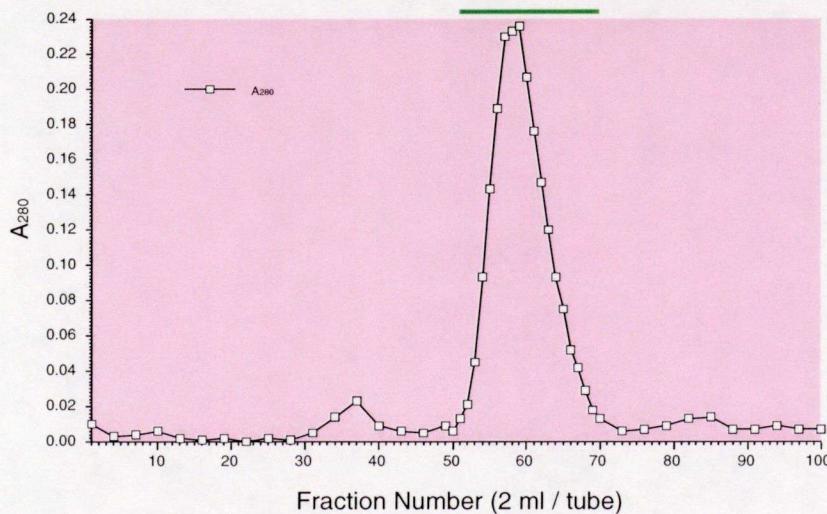
図 2.2: ニホンナシ  $S_3$ -RNase の精製各段階のクロマトグラム

図 (a), (b) 上部に線を付した画分を集めて次のクロマトグラフィーに供した。図 (c) の上部に線を付した画分をニホンナシ  $S_3$ -RNase 画分とした。

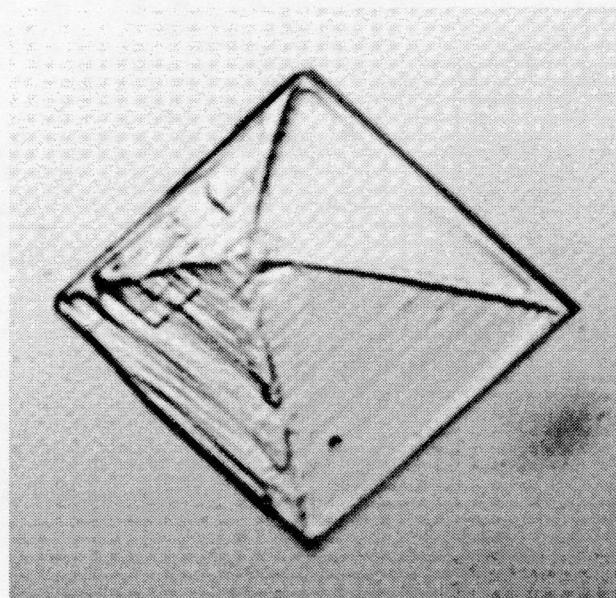


図 2.3: ニホンナシ  $S_3$ -RNase の結晶  
結晶の大きさは約  $0.1 \times 0.1 \times 0.03$  mm である。

## 第3章

# 配偶体型自家不和合性に関するニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) 花柱リボヌクレアーゼの 1.5 Å 分解能結晶構造解析

### 3.1 概要

第2章では、ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) 「長十郎 ( $S_2S_3$ )」より  $S_3$ -RNase を精製し、ネイティブ結晶 (重原子を導入していない結晶) の作製ならびに X 線回折実験について説明した。本章では、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を高分解能で明らかにし、RNase T<sub>2</sub> 型酵素としての S-RNase と配偶体型自家不和合性における雌しべ側 S 遺伝子産物としての S-RNase という 2 つの側面から、得られた立体構造について議論する。

バラ科配偶体型自家不和合性における本研究の意義については、概要で述べたとおりである。当初、得られた回折実験データを基に分子置換法 (MR) による立体構造の解明を試みたが、得られた解が真であると断定することができなかった。そこで、本章では多重同型置換法 (MIR) によって位相問題を解決して立体構造を明らかにした。

S-RNase は第 1.4 節で述べたように RNase T<sub>2</sub> 型酵素に分類される。そこで、本章ではニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を他の立体構造既知の RNase T<sub>2</sub> 型酵素と重ね合わせ、S-RNase の酵素活性と構造との相関について検証する。

ニホンナシ S-RNase には 7 種類の多型が存在し (第 2.1 節)、全てのアミノ酸配列が明らかとなっている。アミノ酸配列比較により、アミノ酸配列の保存性が著しく低い領域が 1 か所見いだされており、花粉側 S 遺伝子産物の識別に関する領域の有力な候補である (第 1.5 節)。また、塩基配列の同義・非同義置換分析によって非同義置換が同義置換を上回る領域が 4 か所見いだされており、これらの領域も花粉側 S 遺伝子産物の識別に関する可能性がある (第 1.5 節)。そこで、これら領域の立体構造を他の RNase T<sub>2</sub> 型酵素と比較し、アミノ酸側鎖の立体配置や分子表面構造について詳細に検討して、S-RNase 特有な構造を考察する。

## 3.2 実験材料、方法

### 3.2.1 実験材料

ニホンナシ (*Pyrus pirifolia*) 「長十郎 ( $S_2S_3$ )」の花は、鳥取県園芸試験場 (鳥取県大栄町) から採花した。S 遺伝子型は交配実験により同定されている [47]。成熟しているが花びらが完全には開いていないバルーン状態から花びらが完全に開いている状態 (ただし開花していない) の花を採集した。採集した花から直ちに雌しべ (柱頭を含む花柱) を切りとりドライアイスで凍結させ、使用直前まで -170°C で保存した。

### 3.2.2 精製、結晶化および X 線回折データ収集

ニホンナシ  $S_3$ -RNase は第 2 章に示した方法で精製し結晶を作成した [51]。得られた結晶は空間群  $P2_1$  に属し、単位格子  $a = 45.65$ ,  $b = 52.59$ ,  $c = 47.57$  Å,  $\alpha = \gamma = 90$ ,  $\beta = 106.45^\circ$  である (第 2.3.2 節, [51])。ネイティブ結晶の X 線回折データは第 2 章で得たものを用いた。また、第 2 章の方法で作製したハンギングドロップのうち単結晶が生じたものの一部について、ハンギングドロップ中の終濃度が 10mM となるように EMTS を加え、20°C, 2 日間静置し EMTS 導入結晶を作製した。同様の手順で 5mM チオシアノ酸水銀 (II) アンモニウム, 1.25mM 酢酸鉛 (II) (いずれもハンギングドロップ中の終濃度) を加えたハンギングドロップを作製し、チオシアノ酸水銀 (II) アンモニウム導入結晶、酢酸鉛 (II) 導入結晶を作製した。これら重原子誘導体結晶の X 線回折データはフォトンファクト

リー(茨城県つくば市)BL-6A ビームラインで X 線検出器 Quantum 4R (ADSC) を用いて収集した。波長は 1.0 Å, カメラ長は 200.0 mm, 振動角は 2.0°, X 線照射時間は 90 秒の条件下 X 線回折データを収集した。プログラム *MOSFLM* [52], *SCALA* [49] を用いてデータを統合した。

### 3.2.3 結晶構造の決定

ウェブサイト *LIBRA* [53] を Structure Prediction mode で使用し、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の一次構造を供して 3D-1D 法による蛋白質の立体構造予測および配列解析を行った。その結果、もっとも類似性が高い分子としてニガウリ種子由来の RNase MC1 [54] が提示されたことから、分子置換法のモデル分子として RNase MC1 を採用した。複数のプログラム *X-PLOR* [55], *AMoRe* [56], *MOLREP* [57] を用いて解析を行ったが、得られた解は真であると断定できるものではなかった。

Patterson マップはプログラム *SOLVE* [58] を用いて解釈し、各重原子誘導体結晶中の重原子の位置を決定した。得られた重原子座標を基にして maximum-likelihood 法による精密化を行うプログラム *SHARP* [59] を用いて 2.5 Å 分解能までのデータで位相を決定した(表 3.1)。得られた位相をプログラム *DM* [49] と *wARP* [60] を用いて改良した。プログラム *DM* [49] を用いて位相を漸次的に 2.5 Å から 1.7 Å まで拡張した。得られた位相をさらに 1.5 Å まで拡張・精密化し、プログラム *wARP* [60] を用いて multiple-refined dummy atomic model の平均化を行った。*wARP* [60] による構造因子の平均化は有効であり、良質な電子密度を得ることができた。プログラム *wARP* [60] により主鎖を自動トレースし、プログラム *O* [61] でモデルを構築した。構造の精密化はプログラム *CNS* [62] を用いて行った。simulated annealing を 1 回行った後エネルギーの最小化と温度因子の最適化を数回繰り返した。得られた結果を基にプログラム *CNS* [62] を用いて composit omit map を作製した。得られたマップを基にモデルを注意深く修正しデータの精密化とモデルの修正を繰り返し行った。分解能は 2.3 Å から 1.5 Å まで漸次拡張した。プログラム *CNS* [62] により水分子を差フーリエ図の電子密度が 3σ 以上のピークから拾い上げた。糖鎖のモデルはウェブサイト *HIC-Up* [63] から入手した。結晶構造は 60–1.5 Å までのデータを使用して R 値 17.2%, free-R 値 20.2% まで精密化した。最終的に得られた結晶構造

は蛋白質 1643 原子, 糖鎖 59 原子, 水 266 分子を含んでいた。プログラム *PROCHECK* [64] を用いて Ramachandran プロットを作製した。全アミノ酸残基のうち 91.5% が most favorable region に, 8.5% が additional allowed region に属しており、generally allowed region や disallowed regions に属するアミノ酸残基は存在しなかった。結晶構造は Protein Data Bank [65] に 1IQQ のアクセションコードで登録された。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 全体構造

ニホンナシ  $S_3$ -RNase の結晶構造は多重同型置換法 (MIR) で決定され、R 値は 17.2%, 分解能は 1.5Å まで精密化を行った。表 3.1 にニホンナシ  $S_3$ -RNase 結晶の統計値をまとめた。

ニホンナシ  $S_3$ -RNase の結晶構造を図 3.1 に示した。分子の大きさはおおよそ 40×50×3Å である。この分子は 6 個の  $\alpha$ -ヘリックス ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 4, \alpha 6-\alpha 8$ ), 2 個の  $3_{10}$ -ヘリックス ( $\alpha 3, \alpha 5$ ), 7 個の  $\beta$ -ストランド ( $\beta 1-\beta 7$ ) から構成される  $\alpha + \beta$  型構造をとっている (図 3.1 (a))。主鎖のトポロジーはクモノスカビ (*Rhizopus niveus*) 由来の RNase Rh [66, 67], トマト (*Lycopersicon esculentum*) 由来の RNase LE [68], ニガウリ (*Momordica charantia*) 由来の RNase MC1 [54] といった立体構造が明らかとなっている RNase T<sub>2</sub> 型酵素とよく一致する (図 3.1 (b))。ニホンナシ  $S_3$ -RNase には二次構造上 2 つの特徴を持っている。一つは  $\alpha 2$ -ヘリックスが他の RNase T<sub>2</sub> 型酵素より短いこと、もう一つは他の RNase T<sub>2</sub> 型酵素には見られない非常に短い  $3_{10}$ -ヘリックス ( $\alpha 3$ : Arg<sup>74</sup>-Lys<sup>76</sup>) が存在することである (図 3.2)。ニホンナシ  $S_3$ -RNase の電子密度図より 4 個のジスルフィド結合 (Cys<sup>15</sup>-Cys<sup>22</sup>, Cys<sup>48</sup>-Cys<sup>91</sup>, Cys<sup>155</sup>-Cys<sup>193</sup>, Cys<sup>170</sup>-Cys<sup>181</sup>) が確認できた。この結果は、ニホンナシ  $S_4$ -RNase やタバコ  $S_2$ -RNase のペプチドフラグメントを質量分析した結果と一致する [69, 70]。

### 3.3.2 触媒部位

RNase T<sub>2</sub> 型酵素の構造と機能の相関は RNase Rh において化学修飾 [71, 72, 73], 部位特異的変異導入 [74, 75, 76, 77, 78, 79], X 線結晶構造解析 [66, 67] により詳細に研究されている。そこで、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と RNase Rh の立体構造を重ね合わせ、触媒部位である P<sub>1</sub> サイトを詳細に比較した (P<sub>1</sub> サイトの呼称は Richards と Wyckoff [80] による RNase A の研究に由来する)。RNase Rh の P<sub>1</sub> サイトを構成するアミノ酸残基を含む  $\beta$ (2)-ストランドと  $\alpha$ (3)-ヘリックスは、それぞれニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の  $\beta$ 2-ストランド,  $\alpha$ 4-ヘリックスと重ね合わせることができた (図 3.1 (b))。このことは、P<sub>1</sub> サイトのトポロジーが両者で似ていることを示している。

図 3.3 (a) に示したように、His<sup>33</sup> と His<sup>88</sup> は RNase Rh において一般酸-塩基触媒として機能している His<sup>(46)</sup> と His<sup>(109)</sup> (括弧内の番号は RNase Rh のアミノ酸残基番号を示す) [67, 72, 75] と重ね合わせることができた。この結果は His<sup>33</sup> と His<sup>88</sup> がニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の触媒部位であることを示唆している。Glu<sup>84</sup> と Lys<sup>87</sup> は、RNase Rh において遷移期にある基質 RNA の反応中間体を安定化する役割を持つ Glu<sup>(105)</sup> と Lys<sup>(108)</sup> [67, 68, 76, 77, 78] と重ね合わせることができた。よって、Glu<sup>84</sup> と Lys<sup>87</sup> もそれぞれ Glu<sup>(105)</sup> と Lys<sup>(108)</sup> と同様の機能を担っていると考えられる。Trp<sup>36</sup> は、RNase Rh において触媒反応に重要な Glu<sup>(105)</sup> と His<sup>(109)</sup> を固定化する役割を持つ Trp<sup>(49)</sup> と対応した (図 3.3 (a))。Trp<sup>(49)N<sup>ε1</sup> は Glu<sup>(105)</sup> の  $\gamma$ -カルボニル基と水素結合を形成しており、Trp<sup>(49)</sup> のインドール環は His<sup>(109)</sup> のイミダゾール環と部分的にスタッキング相互作用している [67]。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase でも Trp<sup>36</sup> と His<sup>88</sup> が同様のスタッキング相互作用を形成している可能性がある。なぜなら、Trp<sup>36</sup> と His<sup>88</sup> との距離が約 3.5 Å であり、各々の環が平行に配置しているためである (図 3.3 (a))。しかし、Trp<sup>36N<sup>ε1</sup> と Glu<sup>84O<sup>ε1</sup> とは 4.59 Å 離れており、水素結合を形成することができない。おそらく、Trp<sup>36N<sup>ε1</sup> と Glu<sup>84O<sup>ε1</sup> の間に水分子 HOH<sup>15</sup> を介して水素結合を形成していると考えられる (図 3.3 (a))。</sup></sup></sup></sup></sup>

### 3.3.3 基質結合部位

RNase Rh の B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> サイト [67, 68] に相当するポケットがニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の P<sub>1</sub> サイトの両側に存在した (図 3.1 (c)) (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> サイトの呼称も Richards と Wyckoff [80] による RNase A の研究に由来する)。そこで、これらのサイトについても第 3.3.2 節と同様にニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と RNase Rh の立体構造を重ね合わせ、詳細に比較した (図 3.3 (b), (c))。

RNase Rh の B<sub>1</sub> サイトを構成する Trp<sup>(49)</sup>, Asp<sup>(51)</sup>, Tyr<sup>(57)</sup> は、それぞれニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の Trp<sup>36</sup>, Ser<sup>38</sup>, Asp<sup>44</sup> に対応した (図 3.3 (b))。Trp<sup>(49)</sup> は 2 つの重要な役割を担っている。一つは第 3.3.2 節で述べたように触媒部位を構成するアミノ酸側鎖の固定であり、もう一つは Tyr<sup>(57)</sup> とともに芳香環の  $\pi$ - $\pi$  スタッキングにより基質 RNA の塩基を認識する役割ある [67, 68]。後者は double-sided スタッキングと呼ばれている。Trp<sup>36</sup> は Trp<sup>(49)</sup> と同様に基質 RNA の塩基と結合すると考えられるが、Tyr<sup>(57)</sup> が Asp<sup>44</sup> に置き換わっているため double-sided スタッキングを形成することができない。 (図 3.3 (b))。ゆえに、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の B<sub>1</sub> サイトでは RNase Rh や RNase LE にみられるような double-sided スタッキングではなく Trp<sup>36</sup> のみによる single-sided スタッキングによって基質 RNA の塩基の認識すると考えられる。RNase Rh / 2'-AMP 複合体の X 立体構造解析によって、Asp<sup>(51)</sup> は 2'-AMP のアデニン塩基と水素結合を形成することで RNase Rh の B<sub>1</sub> サイトにおけるアデニン塩基選択性をもたらしていることが明らかとなっている [67, 68]。一方、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase では Asp<sup>(51)</sup> が Ser<sup>38</sup> に置き換わっている (図 3.3)。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase では dinucleotide monophosphate を基質として基質特異性を調べる実験が行われているが、RNase Rh のような基質選択性は認められなかった (実験結果は省略)。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase における基質選択性の欠如は Asp<sup>(51)</sup>→Ser<sup>38</sup> のアミノ酸置換, Trp<sup>36</sup> の single-sided スタッキング, あるいは両方の要因によるものと考えられる。

RNase Rh の B<sub>2</sub> サイトは、RNase Rh / s(ApC) 複合体の X 線結晶構造解析によって Gln<sup>(32)</sup>, Pro<sup>(92)</sup>, Ser<sup>(93)</sup>, Asn<sup>(94)</sup>, Gln<sup>(95)</sup>, Phe<sup>(101)</sup> と同定されており [67]、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase では Gln<sup>9</sup>, Pro<sup>69</sup>, Asn<sup>70</sup>, Val<sup>71</sup>, Phe<sup>72</sup>, Phe<sup>80</sup> が対応する (図 3.3 (c))。RNase Rh では Phe<sup>(101)</sup> による芳香環スタッキングと Asn<sup>(94)</sup>, Gln<sup>(95)</sup> による van der Waals 力によって B<sub>2</sub>

サイトの塩基認識が行われていると考えられている [68]。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNaseにおいても Phe<sup>80</sup> による van der Waals 力と Val<sup>71</sup>, Phe<sup>72</sup> による芳香環スタッキングによって B<sub>2</sub> サイトの塩基認識が行われていると考えられる (図 3.3 (c))。

### 3.3.4 Hypervariable 領域

バラ科 S-RNase では、S 遺伝子型特異的なアミノ酸配列を持つ HV 領域が 1 か所存在している (図 3.4)。この領域は花粉側 S 遺伝子産物による認識領域として有力である [15]。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の HV 領域は Pro<sup>49</sup>–Gln<sup>63</sup> である。二次構造から見ると Pro<sup>49</sup>–Glu<sup>57</sup> のループ構造と  $\alpha$ 2-ヘリックス (Lys<sup>58</sup>–Ile<sup>67</sup>) の一部である Lys<sup>58</sup>–Gln<sup>63</sup> から構成されている (図 3.1 (a), 3.5)。分子表面に露出したループ構造は一見柔軟性を有するかのように考えられたが、実際にはループを構成する 9 アミノ酸のうち Asn<sup>52</sup>, Arg<sup>54</sup>, Arg<sup>56</sup> が分子内部のアミノ酸と水素結合を形成している。Asn<sup>52</sup>N<sup>δ2</sup> は Asp<sup>97</sup> のカルボニル基と水素結合を形成しており、Asn<sup>52</sup>O<sup>δ1</sup> は水分子 HOH<sup>16</sup> を介して Glu<sup>99</sup> のアミドと水素結合を形成している。Arg<sup>54</sup> の  $\delta$ -グアニジノ基は水分子 HOH<sup>136</sup> や HOH<sup>96</sup> を介して Asn<sup>100</sup>N<sup>δ2</sup> や Asp<sup>97</sup>O<sup>δ1</sup> と水素結合を形成している。Arg<sup>56</sup> の  $\delta$ -グアニジノ基は Asp<sup>82</sup>O<sup>δ1</sup>, Glu<sup>99</sup>O<sup>ε1</sup>, Glu<sup>61</sup>O<sup>ε1</sup> と水素結合を形成している (図 3.6)。

一方、 $\alpha$ 2-helix の一部 (Lys<sup>58</sup>–Gln<sup>63</sup>) を構成する 6 アミノ酸のうち、Leu<sup>60</sup> と Glu<sup>61</sup> は他のアミノ酸と相互作用している (図 3.6)。Leu<sup>60</sup> の側鎖は Leu<sup>64</sup>, Asn<sup>100</sup>, Phe<sup>103</sup>, Ile<sup>107</sup> の側鎖と Arg<sup>56</sup>–Glu<sup>57</sup> の主鎖で構成される疎水的な空間に位置する。Glu<sup>61</sup> の O<sup>ε1</sup> と O<sup>ε2</sup> はそれぞれ Arg<sup>56</sup>N<sup>ε</sup>, Asn<sup>78</sup>N<sup>δ2</sup> と水素結合を形成している (図 3.6)。以上の相互作用によって HV 領域のループとヘリックスは固定 / 安定化されていると考えられる。

HV 領域を構成する 15 アミノ酸のうち Pro<sup>49</sup>, Ile<sup>50</sup>, Lys<sup>51</sup>, Ile<sup>53</sup>, Lys<sup>55</sup>, Glu<sup>57</sup>, Lys<sup>58</sup>, Leu<sup>59</sup>, His<sup>62</sup>, Gln<sup>63</sup> は溶媒と接している。特に Ile<sup>53</sup>, Lys<sup>55</sup>, Glu<sup>57</sup>, Lys<sup>58</sup>, Leu<sup>59</sup> His<sup>62</sup> は分子表面に露出している (図 3.6)。このことは、HV 領域が花粉側 S 遺伝子産物と相互作用可能であり花粉側因子との結合に重要であることを示唆している。

### 3.3.5 正の淘汰を受けている領域

主要組織適合複合体 (MHC) [34, 35, 36], 寄生虫やウイルスの抗原性表面蛋白質 [36], アワビの先体蛋白質 [81, 33] の認識領域では、それぞれの蛋白質をコードする遺伝子の非同義置換数 ( $d_N$ ) が同義置換数 ( $d_S$ ) を上回ることが報告されており、正の淘汰を受けていると考えられている。バラ科 S-RNsae において  $d_S$  と  $d_N$  のウィンドウ解析を行ったところ、 $d_N$  が  $d_S$  を上回り正の淘汰を受けていると考えられる領域を 4 か所 (PS1-PS4) 検出できた (図 3.4) [33]。PS1 領域は HV 領域とほぼ重複していた。バラ科 S-RNase において 4 か所の PS 領域が検出された一方、S 遺伝子型特異的なアミノ酸配列は 1 か所しか検出されないことは興味深い。PS1 (HV) と PS2 領域, PS3 と PS4 領域は立体構造上それぞれニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の活性部位 (P<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> サイト) にあたるクレフトをはさんで両側に位置し、溶媒に接している (図 3.1 (c), 3.5)。

### 3.3.6 糖鎖

ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase は 2 か所の推定 N 型糖鎖結合部位 (Asn<sup>18</sup>, Asn<sup>116</sup>) を持っている (図 3.1 (a))。Asn<sup>18</sup> は S<sub>3</sub>-, S<sub>5</sub>-RNase のみに見られる糖鎖結合部位であり、Asn<sup>116</sup> は全てのバラ科 S-RNase で保存されている糖鎖結合部位である (図 3.4)。二次元糖鎖マップやフラグメントペプチドの質量分析により、2 か所とも不均一な N 型糖鎖を持っており、Asn<sup>18</sup> にはキトビオース (GlcNAc $\beta$ 1→4GlcNAc), Asn<sup>116</sup> にはキシロマンノース型糖鎖が主要な糖鎖として検出された [46]。Asn<sup>116</sup> に結合したキシロマンノース型糖鎖のうち、Man $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→4GlcNAc は電子密度図に当てはめることはできた。Asn<sup>18</sup> のキトビオース, Asn<sup>116</sup> のマンノースとキシロースの電子密度が明確には得られなかつたことは、これらの糖が大きく揺らいでいることを示唆している。糖鎖結合部位である Asn<sup>18</sup> と Asn<sup>116</sup> はそれぞれ活性部位の末端、反対側に位置することから (図 3.1 (a))、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の糖鎖は酵素活性や自他認識には関与しないと考えられる。

### 3.4 考察

ニホンナシ  $S_3$ -RNase の活性部位 (触媒部位の  $P_1$  サイトと基質結合部位の  $B_1, B_2$  サイト) は RNase T<sub>2</sub> 型酵素が持つ典型的な構造である。His<sup>33</sup> と His<sup>88</sup> が一般酸-塩基触媒として機能し、Glu<sup>84</sup> と Lys<sup>87</sup> が遷移期にある基質 RNA の反応中間体を安定化する役割を担っていると思われる。ニホンナシ  $S_3$ -RNase と RNase Rh の  $P_1$  サイトを比較した際の顕著な違いは His<sup>33</sup> のイミダゾール環が His<sup>(46)</sup> と比べて約 90° 回転していることである (図 3.3 (a))。しかし、His<sup>33</sup>N<sup>ε2</sup>-His<sup>88</sup>N<sup>ε2</sup> 間の距離 (7.15Å) は RNase Rh の His<sup>(46)</sup>N<sup>ε2</sup>-His<sup>(109)</sup>N<sup>ε2</sup> 間の距離 (6.71Å) [67] とほぼ同じである。ニホンナシ  $S_3$ -RNase は RNase 活性を持っているので His<sup>33</sup> におけるイミダゾール環の回転は触媒活性に決定的な影響を与えるものではない。もう一つの違いは、RNase Rh において基質 RNA のりん酸基と結合すると考えられる His<sup>(104)</sup> [67, 75] がニホンナシ  $S_3$ -RNase では Lys<sup>83</sup> に置換している点である (図 3.3 (a))。Lys<sup>83</sup> の  $ε$ -アミノ基は  $P_1$  サイトの外側へ向かって伸びており、His<sup>(104)</sup> のイミダゾール環と約 8Å 離れているので、触媒反応中に Lys<sup>83</sup> の側鎖が大きく移動しなければ基質 RNA と相互作用できない。ニホンナシ  $S_3$ -RNase / 基質 RNA 複合体の立体構造が明らかとなれば、以上に述べたニホンナシ  $S_3$ -RNase と RNase Rh との間でみられる差異による活性への影響が明らかになると思われる。

配偶体型自家不和合性における S-RNase の *in vivo* での基質は不明であるが、レセプター説、インヒビター説 (図 1.3) では花粉 (管) の rRNA である [40]。ニホンナシ  $S_3$ -RNase の活性部位の全体構造はいくつかのアミノ酸置換を除いて RNase T<sub>2</sub> 型酵素と非常に類似しているため、ニホンナシ  $S_3$ -RNase に *S* 遺伝子型に対応した厳格な基質特異性はないと考えられる。実際、dinucleotide monophosphate を基質とした実験では基質特異性は見られなかった (実験結果は省略)。したがって、花粉管伸長の阻害における *S* 遺伝子型特異性は酵素の基質特異性ではなく、花粉側 *S* 遺伝子産物との相互作用によるものと考える方が妥当である。

ナス科 S-RNase におけるドメイン置換実験で、*S* 遺伝子型特異的な花粉認識には HV<sub>a</sub>, HV<sub>b</sub> の両領域が必要であることが示された [30, 31]。バラ科 S-RNase では HV 領域が

1か所だけ存在する(図3.4)。ナス科とバラ科のS-RNaseのアミノ酸配列を比較すると[32, 28]、ナス科S-RNaseのHV<sub>a</sub>, HV<sub>b</sub>領域はそれぞれバラ科S-RNaseのHV領域,  $\alpha$ 3-ヘリックス(Arg<sup>74</sup>-Lys<sup>76</sup>)近傍(以下HV<sub>b</sub>'と記す)に対応する。HV<sub>b</sub>'はHV<sub>b</sub>よりもはるかに短く、S遺伝子型特異的なアミノ酸配列は同定されていない(図3.4)。したがって、ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseの $\alpha$ 3-ヘリックス近傍の三次元構造はナス科とバラ科S-RNaseで異なると考えられる。

ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseのHV領域は分子表面に位置しており、花粉側S遺伝子産物等他の分子と容易に相互作用することができる。図3.1(b)に示すようにRNaseT<sub>2</sub>型酵素の主鎖の構造はニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseの $\alpha$ 4,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5を中心に重ね合わせることができる。このように二次構造要素が類似しているにもかかわらず(図3.2)、HV領域の構造は多様である(図3.1(b))。ゆえに、ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseのHV領域Sは遺伝子型特異的な構造であることも考えられる。

ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseのHV領域には5個の酸性アミノ酸Lys<sup>51</sup>, Arg<sup>54</sup>, Lys<sup>55</sup>, Arg<sup>56</sup>, Lys<sup>58</sup>と2個の塩基性アミノ酸Glu<sup>57</sup>, Glu<sup>61</sup>が存在する(図3.4)。これらのアミノ酸によって正または負電荷のクラスターが形成されると考えられたが、各アミノ酸側鎖の方向は分散しておりクラスターは存在しない(図3.6, 3.7)。Arg<sup>54</sup>とArg<sup>56</sup>の $\delta$ -グアニジノ基は水素結合によって電荷が打ち消されているため、HV領域の分子表面は全体として弱く正電荷を帯びている(図3.6, 3.7)。もし、他のニホンナシS-RNase(S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>-S<sub>7</sub>)がニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseと同じ主鎖の構造をとっていれば、HV領域の分子表面も同様に弱く正電荷を帯びており、花粉側S遺伝子産物との相互作用に重要であることが考えられる(図3.4, 3.5, 3.6)。

$d_N$ が $d_S$ を上回るPS領域は、HV領域と同様に花粉側S遺伝子産物結合部位の候補であり、活性部位のクレフトを挟んで両側に分子表面に位置する(図3.5)。PS1(HV), PS2, PS3領域には目立った電荷クラスターが存在せず、親水性で弱く正電荷を帯びている(図3.7)。一方、PS4領域は分子表面に位置するにもかかわらず疎水性で電荷を帯びていない(図3.7)。バラ科S-RNaseでPS領域が広範囲に分布している理由は定かではない。バラ科S-RNaseでは複数の花粉側因子や基質RNAと相互作用している可能性もある。

ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseとS<sub>5</sub>-RNaseのアミノ酸配列の相同性は95.5%である。アミノ酸

置換は 200 残基中 9 か所で全ての置換部位が N 末端側に存在する (図 3.4)。Lys(Arg)<sup>51</sup> と His(Pro)<sup>62</sup> (括弧内のアミノ酸残基名はニホンナシ S<sub>5</sub>-RNase のもの) のアミノ酸置換は HV 領域に存在し、S<sub>3</sub> と S<sub>5</sub> の識別に関与している可能性がもっとも高い (図 3.5)。Lys(Arg)<sup>51</sup> の側鎖は完全に分子表面に露出しており他のアミノ酸残基との相互作用も見られない (図 3.6)。一方、His(Pro)<sup>62</sup> は Glu(Ala)<sup>65</sup> とは一次構造上離れているにもかかわらず立体構造上では近接している。His<sup>62</sup>N<sup>ε2</sup> は水分子 HOH<sup>144</sup> を介して Glu<sup>65</sup>O<sup>ε2</sup> と水素結合しており、分子表面に露出している (図 3.6)。花粉側 S 遺伝子産物による S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の識別機構として 2 つの可能性が考えられる。一つは、1) Lys(Arg)<sup>51</sup>, 2) His(Pro)<sup>62</sup> と Glu(Ala)<sup>65</sup> によって構成される領域, 3) 1), 2) の両方のアミノ酸置換、を認識している可能性であり、

もう一つは His<sup>62</sup>→Pro の置換によって生じると考えられる  $\alpha$ 2-ヘリックスに大規模な構造変化を認識している可能性である。一般に、Pro へのアミノ酸置換はヘリックス構造を壊す傾向にある [82]。現在、ニホンナシ S<sub>5</sub>-RNase の X 線結晶構造解析が当研究室で進行中である。ニホンナシ S<sub>5</sub>-RNase の立体構造が明らかとなれば、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の立体構造を詳細に比較することができ、S<sub>3</sub> と S<sub>5</sub> 遺伝子型の識別機構に関する重要な知見が得られると期待される。

表 3.1: X 線回折実験およびデータの精密化によって得られたニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase 結晶の統計値

<b>Diffraction data statistics</b>					
Data set	Native	Hg1	Hg1'	Hg2	Pb
Resolution (Å)	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Completeness (%)	96.3	99.7	100.0	98.2	99.7
Unique reflections	33441	7483	7536	7450	7667
R <sub>merge</sub> <sup>*a</sup>	5.7	8.5	10.1	5.2	11.5
R <sub>iso</sub> <sup>*b</sup>		0.125	0.131	0.320	0.181
<b>Phasing statistics</b>					
R <sub>cullis</sub> <sup>*c</sup>		0.88	0.92	0.85	0.97
Phasing power <sup>*d</sup> (Centrics/Acentrics)	0.97/0.96	1.18/1.45	1.64/1.68	1.04/0.9	
Figure of merit <sup>*e</sup> (Centrics/Acentrics)		0.57/0.66			
<b>Refinement statistics</b>					
Resolution range (Å)	500–1.5				
R-factor <sup>*f</sup> (%)	17.2				
Free-R-factor (%)	20.2				
Rms deviation from ideality					
Bond distance (Å)	0.022				
Bond angles (°)	2.02				

<sup>\*a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I_{\text{obs}} - I_{\text{calc}}| / \sum I_{\text{obs}}$

<sup>\*b</sup>  $R_{\text{iso}} = \sum ||F_{\text{deliv}}| - |F_{\text{native}}|| / \sum |F_{\text{native}}|$ , Diffraction data were proceeded by *DENZO* and *SCALEPACK* [48](native) or *MOSFLM* [52] and *SCALA* [49](derivative)

<sup>\*c</sup>  $R_{\text{cullis}} = \sum ||F_{\text{Hobs}}| - |F_{\text{Hcalc}}|| / \sum |F_{\text{Hobs}}|$ , for centric reflections, where  $F_{\text{Hcalc}}$  and  $F_{\text{Hobs}}$  are the observed and calculated heavy atom structure factor amplitudes.

<sup>\*d</sup> Phasing power =  $\text{rms}(|F_H|/E)$ , where  $F_H$  is the atom structure factor amplitude, and  $E$  the residual lack of closure error.

<sup>\*e</sup> Figure of merit =  $\langle \cos(\alpha - \alpha_{\text{best}}) \rangle$

<sup>\*f</sup> R-factor =  $\sum ||F_{\text{obs}} - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$

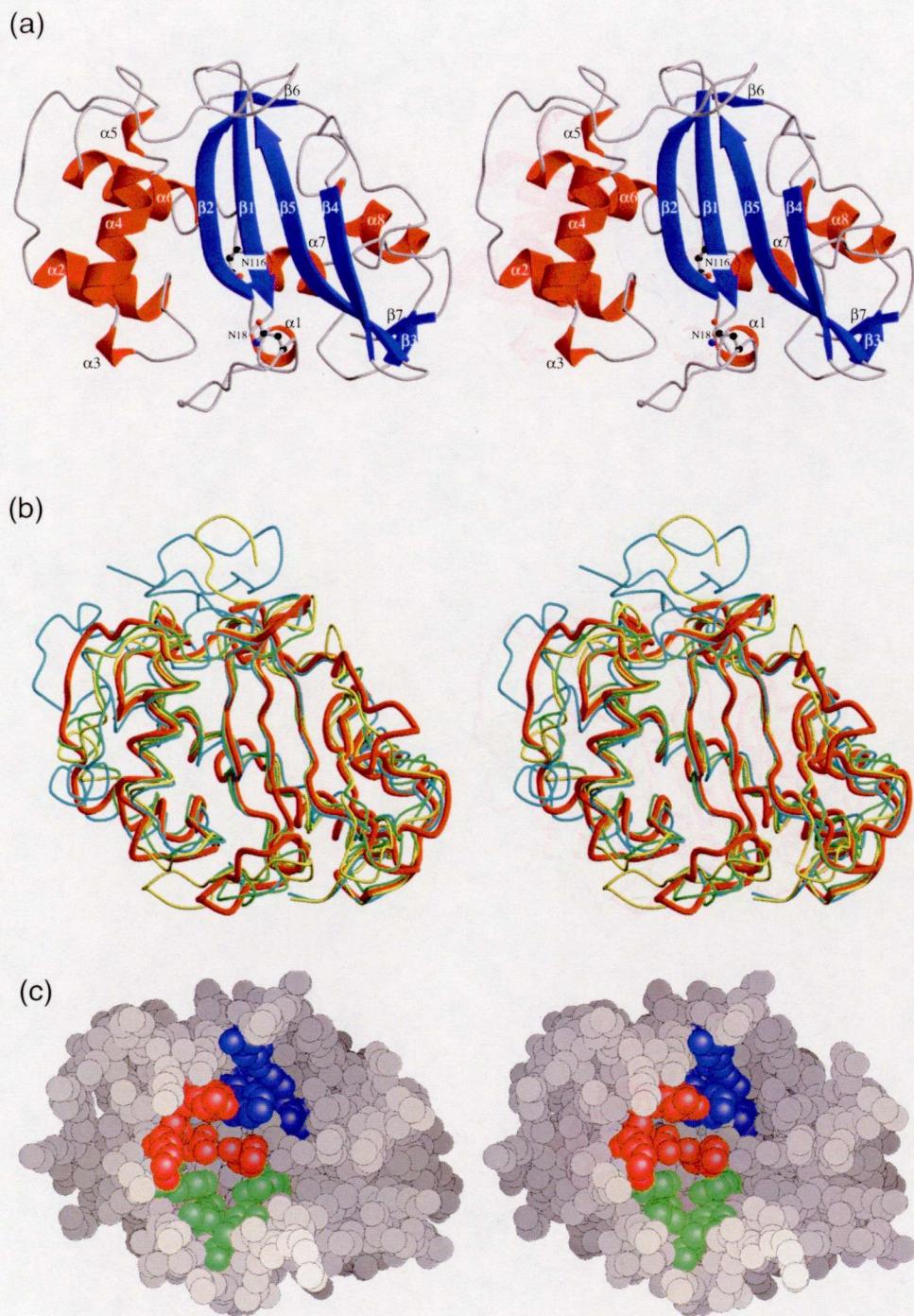


図 3.1: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の全体像 (ステレオ図)

(a) ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase のリボンモデル。糖鎖結合部位である Asn<sup>18</sup>, Asn<sup>116</sup> を ball-and-stick で示した。(b) RNase T<sub>2</sub> 型酵素の立体構造の重ね合わせ。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase を赤, RNase Rh [67] を水色, RNase LE [68] を黄, RNase MC1 [54] を緑で示した。立体構造はプログラム DEJAVU [83] を用いて重ね合わせた。(c) ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の space-fill モデル。P<sub>1</sub> サイトのアミノ酸を赤, B<sub>1</sub> サイトのアミノ酸を青, B<sub>2</sub> サイトのアミノ酸を緑で示した。P<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> の名称は RNase A の例 [80] に倣った。(a), (b) はプログラム MOLSCRIPT [84] と RASTER3D [85] で, (c) はプログラム GRASP [86] で作成した。

	1	10	20	30	40	
	*	*	*	*	*	
	$\beta_1$		$\alpha_1$	$\beta_2$		
S3	YDYFQFTQQYQLAVCNSNRT--LCKDPPDKLFTVHGLWPSNM					
LE	AKDFDFFYFVQQWPGSYCDTKQSCCYPTTGKPAADFGIHLGLWPNN					
MC1	FDSFWFVQQWPPAVCSFQKS--GSCPGSGLRRTFIHGLWPQQ-					
Rh	SSCSSTALSCSNSANSDTCCSPEYGLVVLNMQWAPGYG-----PDNAFTLHGLWPDKC					
	50	60	70	80	90	
	*	*	*	*	*	
	$\alpha_2$		$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_5$	
S3	VGPD-PSK-C-P-IKNI--RKREKL---LEHQLEIIWPNVFD-RTKNNLFWDKEWMK					<b>HGSC</b> GYPT
LE	DGTY-PSN-CDPNSPYD--QSQIISD---LISSMQQNWPPLACPSGSG					<b>STFW</b> SHEWEK
MC1	SGTSLT-N-C-PGSPFD--ITKISH---LQLSQLNTLWPNVLR--ANNQQFWSHEWTK					<b>HGTC</b> SEST
Rh	SGAYAPSGGCDSNRASSSIAASVIKSKDSSLVNSMLTYWPSNQG--NNNVFWWSHEWSK					<b>HGTCV</b> STY
	100	110	120	130	140	150
	*	*	*	*	*	*
	$\alpha_6$		$\alpha_7$	$\beta_3$	$\alpha_8$	
S3	ID-----NENHYFETVIKMYISKKQNVSRLSKAKIEPDGKKRALLDIENAIRNGADNKKP					
LE	LT-----NQHAYFKKALDLKNQID--LLSILQGADIHPDGESYDLVNIRNAIKSAIG-YTP					
MC1	F-----NQAAVFKLAVDMRNYYD--TIGALRPHAAAGPNGRTKSRQAIGFLKAKFG-KFP					
Rh	D <b>PDC</b> YDNYEEGEDIVDYFQKAMDLRSQYN--VYKAFSSNGITPGGTYTATEMQSATESYFG-AKA					
	160	170	180	190	200	
	*	*	*	*	*	
	$\beta_4$		$\beta_5$	$\beta_6$	$\beta_7$	
S3	KLKCQKK--GTTTELVEITLCSDKSG--EHFIDCPHPFEPISPHYCPTNNIKY					
LE	WIQCND-QSGNSQLYQVYICVDGSG--SSLIECPIF---PGGKGCTSIEFPTF					
MC1	GLRCRTDPQTKVSYLVQVVAFCAQDG--STLIDCTRD-----TCGANFIF					
Rh	KIDCSS-----GTLSDVALYFYVRGRDTYVITDALST-----GSCSGDVEYPTK					

図 3.2: RNase T<sub>2</sub> 型酵素のアミノ酸配列アライメントと二次構造

アミノ酸残基番号はニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase のものを示した。 $\alpha$ -ヘリックスを構成するアミノ酸を赤、 $\beta_{10}$ -ヘリックスを構成するアミノ酸を赤の斜体、 $\beta$ -ストランド構成するアミノ酸を青で示した。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の二次構造はプログラム DSSP [87] を用いて決定した。

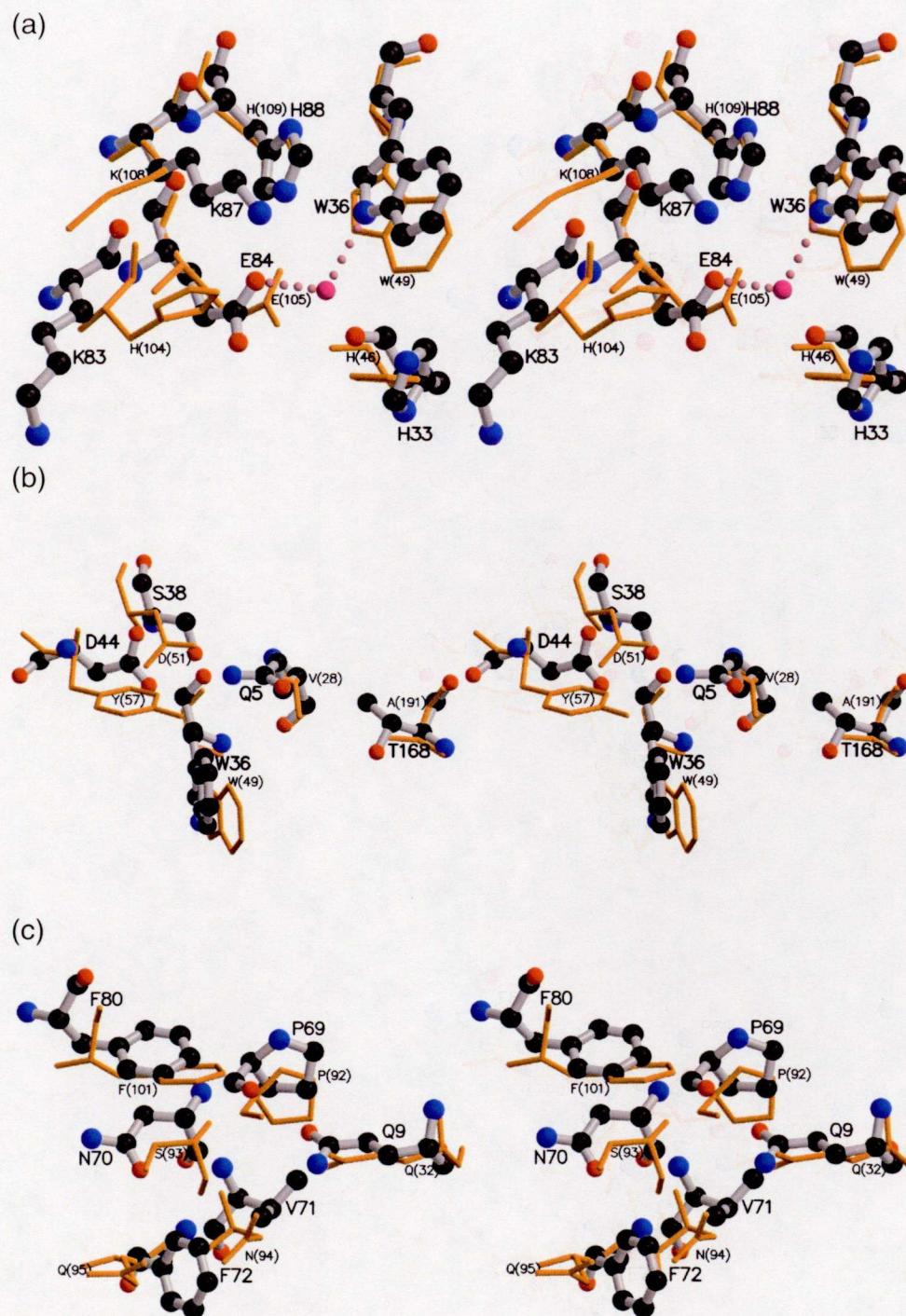
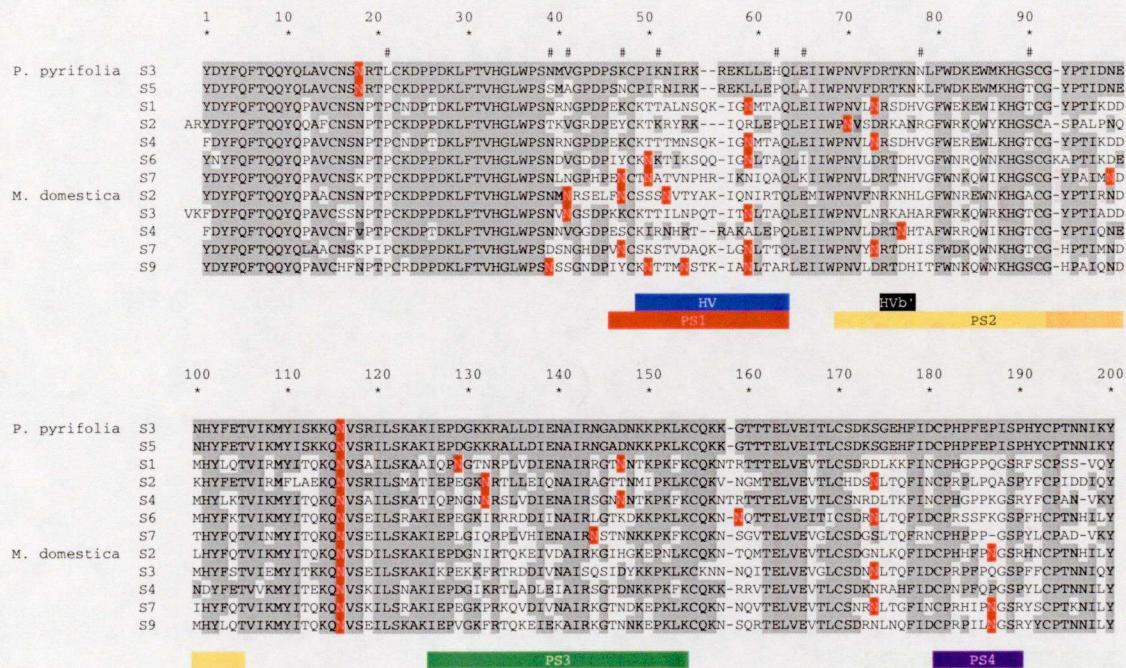


図 3.3: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と RNase Rh の活性部位を構成するアミノ酸残基の立体構造の重ね合わせ(ステレオ図)

(a) 触媒反応を行う P<sub>1</sub> サイト, (b) 基質塩基と結合する B<sub>1</sub> サイト, (c) 基質塩基と結合する B<sub>2</sub> サイト。P<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> の名称は RNase A の例 [80] に倣った。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase のアミノ酸を ball-and-stick, RNase Rh のアミノ酸を橙で示した。両者の立体構造はプログラム DEJAVU [83] を用いて重ね合わせた。プログラム MOLSCRIPT [84] と RASTER3D [85] で作成した。

図 3.4: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の HV, PS 領域の配置

*P. pyrifolia* はニホンナシ, *M. domestica* はリンゴを示す。HV, PS 領域は HV を青, HVb' を黒, PS1 を青と赤, PS2 を黄, PS3 を緑, PS4 を紫の帯で示した。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と共通のアミノ酸残基に陰を付した。ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase 間で異なるアミノ酸残基はアライメント上部に#で示した。糖鎖結合部位は赤地に白の文字で示した。

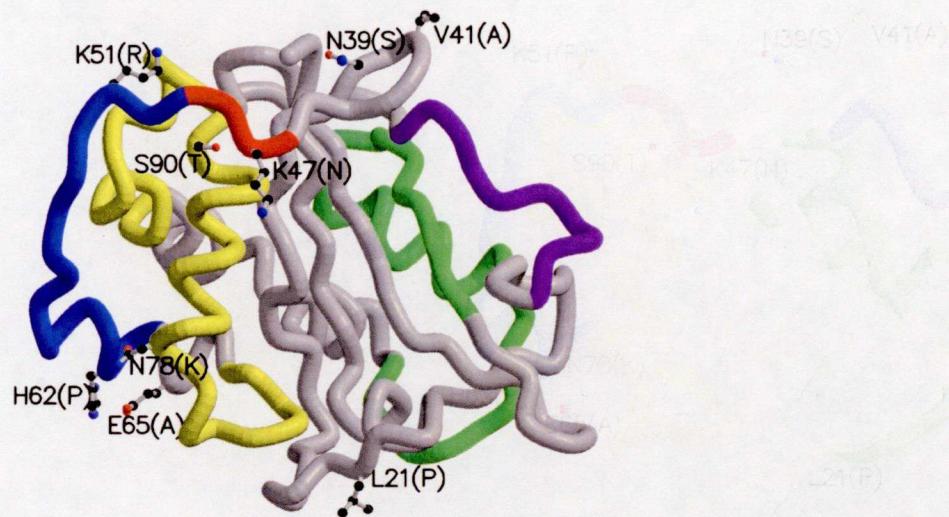


図 3.5: ニホンナシ  $S_3$ -RNase の HV, PS 領域の立体配置

図 3.4 と同様に HV を青, PS1 を青と赤, PS2 を黄, PS3 を緑, PS4 を紫で示した。 $S_3$ -RNase と  $S_5$ -RNase との間でアミノ酸置換が見られる残基を ball-and-stick で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D* [85] で作成した。

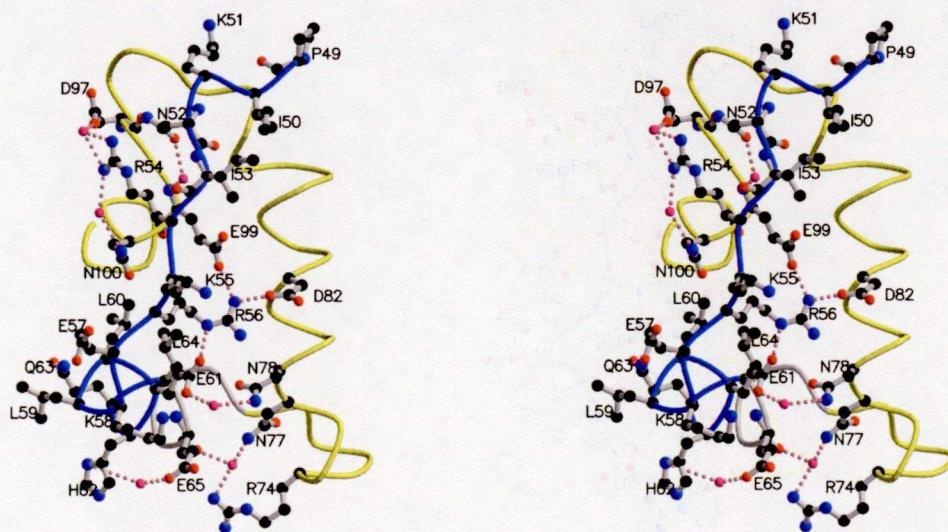


図 3.6: ニホンナシ  $S_3$ -RNase の HV (PS1), PS2 領域 (ステレオ図)

図 3.4 と同様に HV を青, PS2 を黄で示した。水分子をピンク, 水素結合をピンクの点線で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D* [85] で作成した。

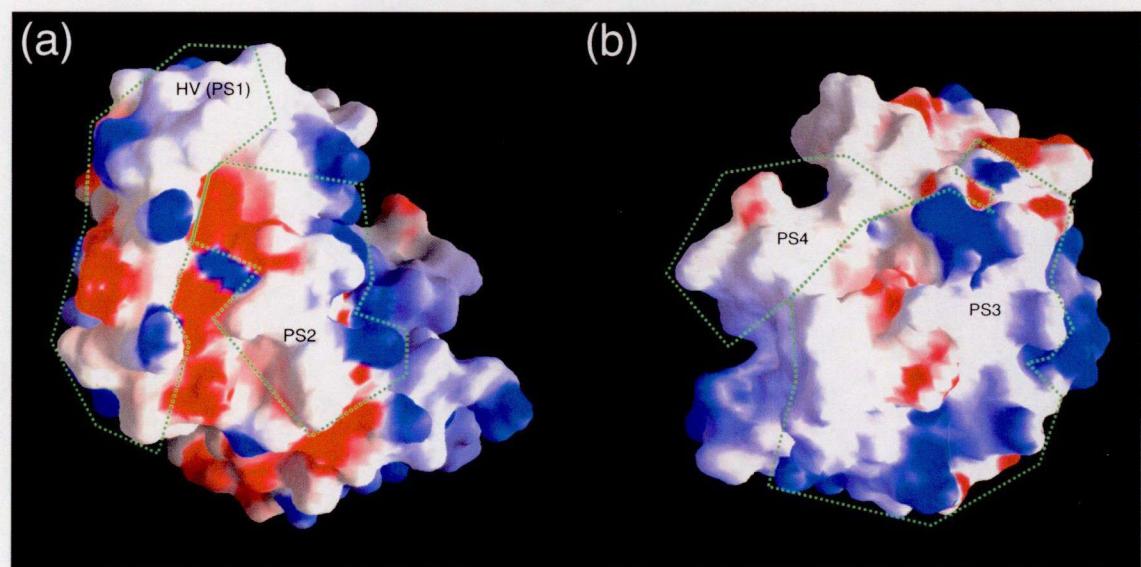


図 3.7: ニホンナシ  $S_3$ -RNase 各 PS 領域の表面電荷

(a) HV (PS1) と PS2 領域, (b) PS3 と PS4 領域。表面電荷は  $-10$ – $+10$   $k_B T$  の範囲で負電荷を赤、正電荷を青で示した。プログラム *GRASP* [86] で作成した。

## 第4章

# ニホンナシ $S_3$ -RNase と $S_5$ -RNase の立体構造比較

### 4.1 概要

本研究で決定したニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造から花粉側因子に対する認識部位予測をさらに詳細に遂行するためには、非常に類似なアミノ酸配列の相同性をもつニホンナシ  $S_5$ -RNase との立体構造の比較が有効な方法の一つであると考えられる。 $S_5$ -RNase は  $S_3$ -RNase と 95.5% のアミノ酸配列の相同性があり、200 残基中 9 残基のアミノ酸置換しか存在しない。HV および PS 領域内に限れば 5 残基のアミノ酸置換である(図 4.1)。このような類似性にもかかわらず、花粉側因子が異なった  $S$  遺伝子型であると認識できることは、これらの S-RNase の認識部位の立体構造が微妙に異なっていることを示唆している。

残念ながら  $S_5$ -RNase の結晶化には成功していないため、本章では  $S_3$ -RNase の立体構造をもとにアミノ酸変異を導入し、エネルギーの最小化を行って  $S_5$ -RNase の立体構造を予測した。そして、予測された立体構造を  $S_3$ -RNase の立体構造と比較し、花粉側因子に対する認識部位を検討した。

### 4.2 実験材料、方法

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*)  $S_3$ -RNase の立体構造データは、第3章で得たものを用いた(PDB:1IQQ) [88]。ニホンナシ  $S_5$ -RNase の立体構造は、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を基に、プログラム  $O$  [61] を用いてニホンナシ  $S_5$ -RNase でのアミノ酸置換部位に

変異を導入し、プログラム *CNS* [62] でエネルギーの最小化を行ったものを作成し用いた。リンゴ野生種 (*Malus transifolia*) S<sub>t</sub>-RNases の立体構造は、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の立体構造を基に、ニホンナシ S<sub>5</sub>-RNase の場合と同様の処理を行ったものを用いた。立体構造の変化がエネルギーの最小化処理に由来するかアミノ酸置換に由来するかを検証するため、ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase の立体構造にプログラム *CNS* [62] でエネルギーの最小化処理を行ったものを対照として作成した。得られた立体構造は、プログラム *DEJAVU* [83] を用いて重ね合わせ、プログラム *O* [61] を用いて表示し立体構造の比較を行った。立体構造の類似性の指標として平均二乗距離 (RMSD) を用いた。

### 4.3 結果および考察

ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の 9 か所のアミノ酸置換を S<sub>3</sub>-RNase に導入し、エネルギーの最小化をして得られた S<sub>5</sub>-RNase 推定立体構造を図 4.2 に示す。全体的な主鎖のフォールディングと立体配置は S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase でほとんど変化せず、0.99 Å の RMSD 値で重ね合わせることができる。HV や PS 領域の主鎖の立体配置にも際立った変化は見られない (図 4.2, 4.3)。当初、His<sup>62</sup> から Pro<sup>62</sup> への変異が  $\alpha$ 2-ヘリックスの立体配置に何らかの影響を及ぼすと予想されたが、図 4.3 に示すように  $\alpha$ 2-ヘリックスもほぼ完璧に重ね合わすことができる。

次に、アミノ酸側鎖を比較すると、9 か所の変異アミノ酸残基も含めて、S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の側鎖の方向と立体配置もほとんど一致している。両 S-RNase 間における際立った変異は、S<sub>5</sub>-RNase の Gln<sup>63</sup>, Tyr<sup>93</sup> の 2 種類のアミノ酸側鎖の立体配置で、ともに S<sub>3</sub>-RNase の Gln<sup>63</sup>, Tyr<sup>93</sup> に比べて 90° 回転していることである (図 4.2)。これらのアミノ酸残基は、変異部位 His<sup>62</sup>→Pro および Lys<sup>51</sup>→Arg に近接しており、これらの変異が側鎖の立体配置に影響を与えたと考えられる。図 4.4 に S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の表面電荷分布を示した。S<sub>3</sub>-RNase と比べて S<sub>5</sub>-RNase には Glu<sup>65</sup>→Ala と Asp<sup>78</sup>→Lys の変異により HV 領域周辺に 1 か所の負電荷の消失と 1 か所の正電荷の出現が観察されるが、それ以外にはほとんど差異が見られない。以上の結果をまとめると、予測された S<sub>5</sub>-RNase の立体構造は、アミノ酸の主鎖・側鎖の立体位置および分子表面電荷分布において、全体的に

$S_3$ -RNase とほとんど変化なく、花粉側因子は変異したアミノ酸部分のみをミクロに認識している可能性が示唆される。

最近、ニホンナシと同じバラ科に属すリンゴ野生種において、 $S_5$ -RNase と同じく 200 残基中 9 残基のみ変異した  $S_t$ -RNase の cDNA が単離された。 $S_3$ -RNase と  $S_t$ -RNase 間の変異は、HV および PS 領域に限れば 2 残基のみ ( $\text{His}^{62} \rightarrow \text{Pro}$ ,  $\text{Ala}^{134} \rightarrow \text{Thr}$ ) である。 $S_5$ -RNase と同様に、 $S_3$ -RNase にアミノ酸変異を導入してエネルギーの最小化により  $S_t$ -RNase の立体構造を予測した (図 4.4, 4.5)。 $S_3$ -RNase との立体構造比較の結果も  $S_5$ -RNase の場合と同様で、RMSD 値も 0.98 Å であった。アミノ酸の主鎖・側鎖の立体位置 (図 4.5) および分子表面電荷分布 (図 4.4) においても、 $S_3$ -RNase と顕著な差異は見られない。 $S_5$ -RNase と  $S_t$ -RNase に共通しているのは  $\text{His}^{62} \rightarrow \text{Pro}$  の変異である。通常、ヘリックスに局在するアミノ酸残基を Pro に置換するとヘリックスの構造が変化する傾向にあるが [82]、予測された  $\alpha$ 2-ヘリックスの構造には  $\text{His}^{62} \rightarrow \text{Pro}$  変異の影響が表れていない。しかし、花粉側因子と結合する時の  $\alpha$ 2-ヘリックスの構造変化が、 $S_3$ -RNase と  $S_5$ -RNase ( $S_t$ -RNase) 間で微妙に異なるいるのかもしれない。

以上の考察はすべて予測された  $S_5$ -RNase と  $S_t$ -RNase の構造を基にしたものである。エネルギー最小化による構造予測には限界があり、最終的には実際に X 線結晶構造解析して得られる  $S_5$ -RNase や  $S_t$ -RNase の立体構造と比較しなければならない。現在、当研究室において  $S_5$ -RNase の X 線結晶構造解析が進行中で、 $S_5$ -RNase の立体構造が決定されれば、花粉側因子に対する認識部位についてさらに重要な知見が得られると期待される。

	1	10	20	30	40	50	60	
	*	*	*	*	*	*	*	
								<-   <- HV (PS1)
P.p.S3	YDYFQFTQQYQLAV	CNSNRTLCKDPPDKL	FTVHGLWP	SNMVGPDP	SKCPIKNIRKRE	KLL		
P.p.S5	YDYFQFTQQYQLAV	CNSNRTCPCKDPPDKL	FTVHGLWP	SSMAGPDP	NCPIRNIRKRE	KLL		
M.t.St	YDYFQFTQQYQLAV	CNSNRTLCKDPPDKL	FTVHGLWP	SSMVGPDP	SKCPIKNIRKRE	KLL		
	61	70	80	90	100	110	120	
	*	*	*	*	*	*	*	
				PS2				->
P.p.S3	EHQLEIIWPNVFD	RTKNNLFWDKEWMK	H	GSC	GYPTIDN	ENHYFETVIKMY	ISKKQNV	SRI
P.p.S5	EPQLAIIWPNVFD	RTKNNLFWDKEWMK	HGTC	GYPTIDN	ENHYFETVIKMY	ISKKQNV	SRI	
M.t.St	EPQLEIIWPNVFD	RTKNNLFWDKEWMK	HGSC	GYPTIDN	ENHYFETVIKMY	ITKKQNV	SEI	
	121	130	140	150	160	170	180	
	*	*	*	*	*	*	*	
			PS3		->			
P.p.S3	LSKAKIEPDGKKR	ALLDIENAIRN	GADNKKPKL	KCQKKGTT	TELVEIT	LCSDKSGE	HFIG	
P.p.S5	LSKAKIEPDGKKR	ALLDIENAIRN	GADNKKPKL	KCQKKGTT	TELVEIT	LCSDKSGE	HFIG	
M.t.St	LSKAKIEPDGKKR	LLDIENAIRN	GADNKKPKL	KCQKKGRM	TELVE	VTLCSDKSGE	HFIG	
	181	190	200					
	*	*	*					
				<-PS4 ->				
P.p.S3	CPHPFEPISPHYC	PTNNIKY						
P.p.S5	CPHPFEPISPHYC	PTNNIKY						
M.t.St	CPHPFEPISPHFC	PTNNIKY						

図 4.1: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase, S<sub>5</sub>-RNase, リンゴ野生種 S<sub>t</sub>-RNases のアミノ酸配列アライメント  
P.p. はニホンナシ, M.t. はリンゴ野生種を示す。

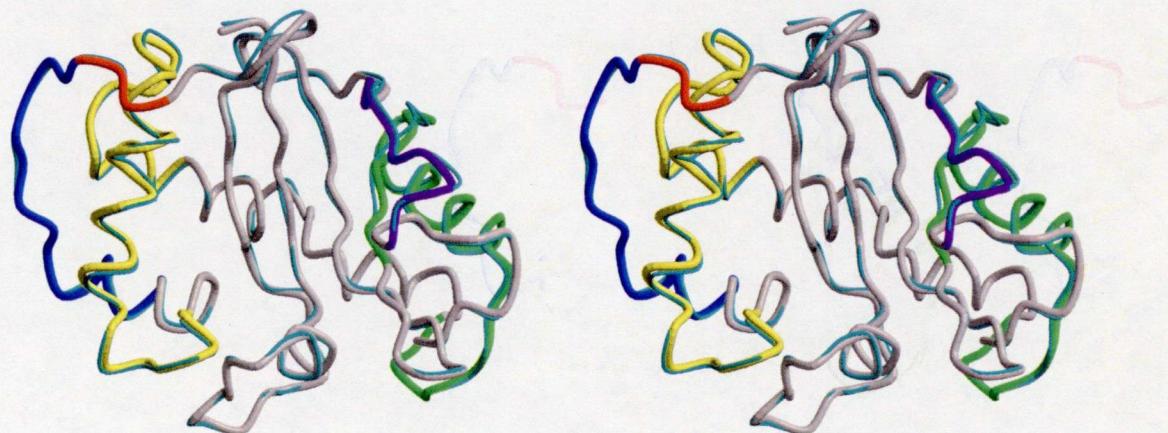


図 4.2: ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase と S<sub>5</sub>-RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図)

図 3.4 と同様に HV を青, PS1 を青と赤, PS2 を黄, PS3 を緑, PS4 を紫で示した。  
S<sub>5</sub>-RNase は水色で示した。プログラム MOLSCRIPT [84] と RASTER3D [85] で作成した。

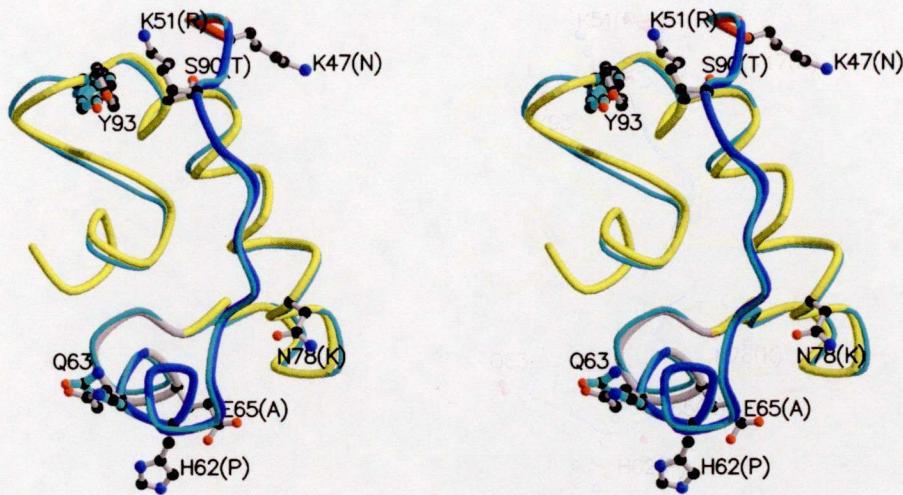


図 4.3: ニホンナシ  $S_3$ -RNase と  $S_5$ -RNase の立体構造の重ね合わせ: HV (PS1) 領域 (ステレオ図)  
 図 3.4 と同様に HV を青, PS1 を青と赤, PS2 を黄で示した。両者でアミノ酸側鎖の出方が  
 大きき異なる箇所を ball-and-stick で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D*  
 [85] で作成した。

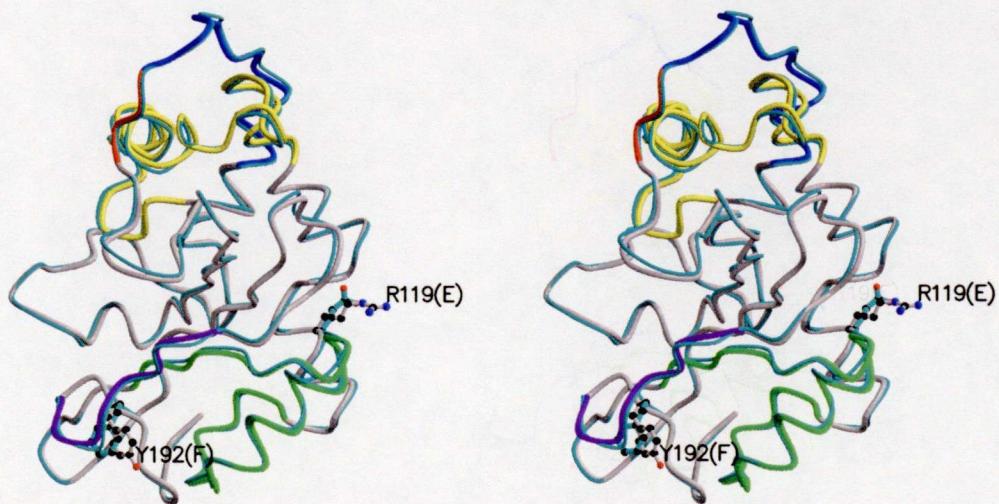


図 4.4: ニホンナシ  $S_3$ -RNase とリンゴ野生種  $S_t$ -RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図)  
 図 3.4 と同様に HV を青, PS1 を青と赤, PS2 を黄, PS3 を緑, PS4 を紫で示した。リン  
 ゴ野生種  $S_t$ -RNase は水色で示した。両者でアミノ酸側鎖の出方が大きき異なる箇所を  
 ball-and-stick で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D* [85] で作成した。

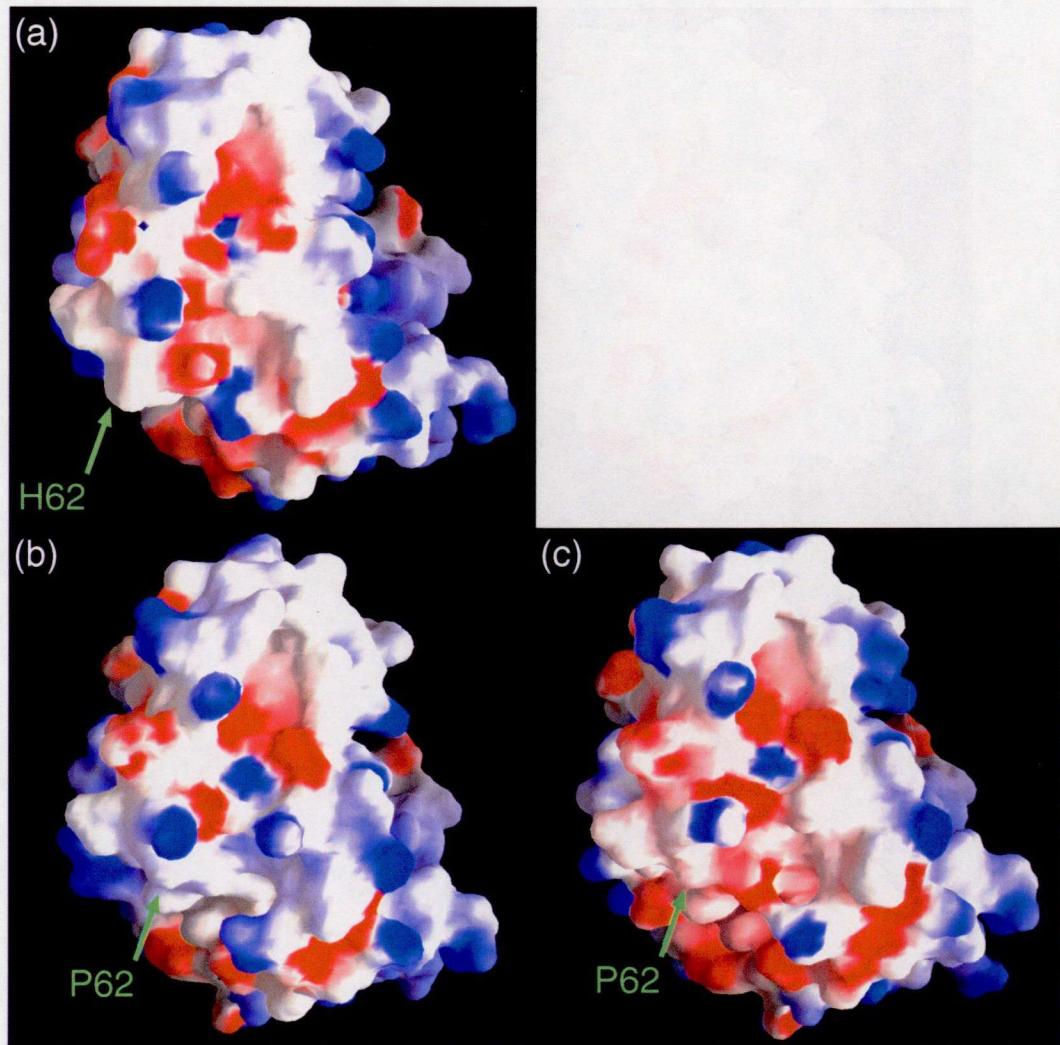


図 4.5: PS1 (HV), PS2 領域の表面電荷

(a) ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase, (b) ニホンナシ S<sub>5</sub>-RNase, (c) リンゴ野生種 S<sub>1</sub>-RNase。表面電荷は  $-10$ – $+10$   $k_B T$  の範囲で負電荷を赤、正電荷を青で示した。プログラム GRASP [86] で作成した。

## 第5章

# バラ科およびナス科 S-RNase の構造と機能の比較

### 5.1 概要

現在までに配偶体型自家不和合性因子としての S-RNase が報告されている植物は、バラ科、ナス科およびゴマノハグサ科由来のものである。形態学的に、ナス科とゴマノハグサ科は非常に近縁な種であるが、バラ科とナス科は、具体的な数値は示されていないが、かなり早期に分化したと考えられている（図 5.1）。そのため、ナス科とゴマノハグサ科の S-RNase は共通の祖先から分化したと考えられているが、バラ科とナス科の S-RNase は進化上繋がりはなく、それぞれの植物において普遍的な RNase T<sub>2</sub> 型酵素を転用した自家不和合性機構を独立に獲得したという意見が大勢を占めている。バラ科 S-RNase はナシ属、リンゴ属およびサクラ属（アーモンド、チェリー）由来のものが知られている。ナシ属とリンゴ属はナシ亜科 (Maloideae) に、サクラ属はサクラ亜科 (Amygdaloidea) に分類され、アミノ酸配列から構築された S-RNase の系統樹においても S-RNase はナシ亜科由来のものとサクラ亜科由来のものに分類される。一方、ナス科 S-RNase はこれらのバラ科 S-RNase のいずれのグループにも属さず、ゴマノハグサ科とともに系統樹上で独立のグループを形成している（図 5.2, [1]）。自家不和合性の獲得がバラ科とナス科で独立に起つたとすれば、図 5.2 の系統樹は当然の結果と言える。

アミノ酸配列から見たバラ科とナス科の S-RNase の相同性をまとめると、1) 約 200 残基のアミノ酸からなる、2) 触媒部位が 2 つの His である、3) それらの周辺に約 10 残基か

ら成る相同的なアミノ酸配列がある, 4) 8か所のシステイン残基の位置がほぼ一致している、の4点を挙げることができる。しかし、アミノ酸配列全体では25%以下の相同性しか有していない。また、バラ科では1か所のHV領域しか見られないのに対して、ナス科では2か所のHV領域(HV<sub>a</sub>, HV<sub>b</sub>)が見い出されている。さらに、保存されている糖鎖結合位置は全く異なり、遺伝子の同義・非同義置換分析によるPS領域はナス科では検出されていない。

アミノ酸配列の比較からバラ科とナス科S-RNaseの類似性と相違性を議論する試みはなされてきたが、アミノ酸配列情報だけでは重要な知見が得られなかった。本研究でバラ科ニホンナシS<sub>3</sub>-RNaseの立体構造を明らかにしたが、本研究成果とほぼ同時に横浜市立大学の井田らによりナス科タバコ(*Nicotiana alata*)S<sub>F11</sub>-RNaseの立体構造も1.55Åの分解能で決定された[89]。そこで、本章では独立に進化してきたと考えられるバラ科とナス科のS-RNaseについて立体構造の類似性と相違性を明らかにし、収束的進化の結果としての類似性からS-RNaseに必須な構造単位と機能の関係を議論する。さらに、S-RNaseの相違性からバラ科とナス科の自他認識機構の相違と花粉側因子の差異について考察する。

## 5.2 実験材料, 方法

ニホンナシ(*Pyrus pyrifolia*)S<sub>3</sub>-RNaseの立体構造データは、第3章で得たものを用いた(PDB:1IQQ)[88]。タバコ(*Nicotiana alata*)S<sub>F11</sub>-RNaseの立体構造データは、Protein Data Bank[65]で公開されているものを用いた(PDB:1IOO)[89]。両者の立体構造は、プログラム*DEJAVU*[83]を用いて重ね合わせ、プログラム*O*[61]を用いて表示し立体構造の比較を行った。立体構造の類似性の指標として平均二乗距離(RMSD)を用いた。

## 5.3 結果および考察

バラ科S<sub>3</sub>-RNaseとタバコS<sub>F11</sub>-RNaseの立体構造を図5.3に示す。両S-RNaseとも8個のヘリックス(α1-α8)と7個のβ-ストランド(β1-β7)から成り(図5.3)、保存されている糖鎖結合位置は異なっているが、糖鎖が分子の裏側(基質結合部位や触媒部位が存在する面を分子の表側とする)から溶媒中に突き出している。活性部位の立体構造を比較する

と、触媒部位である  $P_1$  サイト、基質結合部位である  $B_1$  および  $B_2$  サイトの全体的な形と分子内の位置は非常に類似しており(図 5.4)、それぞれのサイトを構成するアミノ酸残基も、 $S_3$ -RNase と  $S_{F11}$ -RNase 間で重ね合わせることができる(図 5.5)。このことは、RNase 活性を発現する活性部位の立体構造は極めて普遍的で、分子進化的にも安定な構造であると言える。 $S_3$ -RNase は塩基非特異的に RNA を分解することが合成基質を用いた実験により明らかにされている。 $S_{F11}$ -RNase の塩基特異性に関する実験はなされていないが、 $B_1$  および  $B_2$  サイトの立体構造から、 $S_3$ -RNase と同様に塩基非特異的であると考えられる。以上をまとめると、S-RNase の活性部位の立体構造はバラ科、ナス科を問わず保存的で、塩基非特異的な酵素活性が自家不和合性に必須であると考えられる。

$S_3$ -RNase、 $S_{F11}$ -RNase の主鎖のフォールディングを重ね合わせると  $1.06\text{\AA}$  の RMSD 値で重ね合わすことができた。活性部位が存在する領域は、ほぼ完全に重ね合わすことができるが、HV や PS 領域近傍でかなりのずれが生じている(図 5.6)。PS2 領域の後半と PS3 領域は比較的類似しているため、本章では HV(PS1) 領域、PS2 領域の前半および PS4 領域の相違性について議論する。

第 3 章で議論したように、HV 領域と PS2 領域の前半は花粉側因子に対する認識部位として最も可能性が高い領域である。ナス科 S-RNase にはバラ科に見られない HVb が存在する。この領域はバラ科 S-RNase の PS2 領域前半に位置する  $\alpha_3$  に相当する。HV 領域(ナス科では HVa 領域)のアミノ酸配列を比較すると(図 5.7)、ナス科 S-RNase には 52, 54, 55 位に疎水性側鎖をもつアミノ酸(Tyr, Phe, Leu, Val, Ile)が出現する頻度が高く、特に 52 位は今までに一次構造が決定されている S-RNase すべてにおいて疎水性アミノ酸で占められている。バラ科 S-RNase の HV 領域のアミノ酸配列は非常に多様性に富み、構成するアミノ酸残基数も一定ではなく、ナス科 S-RNase の 52–54 位に見られるような疎水性アミノ酸のクラスターも見られない。 $S_3$ -RNase と  $S_{F11}$ -RNase の HV 領域はともにループ構造と  $\alpha_2$ -ヘリックスから構成され、 $\alpha_2$ -ヘリックス部分の主鎖はほぼ完全に重ね合わせができるが、ループ部分の主鎖はかなり異なっている(図 5.6)。 $S_3$ -RNase のループは  $S_{F11}$ -RNase より大きな弧を描いて溶媒中に露出している。HV 領域の内側にある  $\alpha_4$ -ヘリックスからの距離で比較すると、 $S_3$ -RNase のループのほうが最大で  $2\text{\AA}$  外側に張り出している。そのため、 $S_3$ -RNase の HV 領域のループと  $\alpha_4$ -ヘリックスの間には、

$S_{F11}$ -RNase には見られないクレフトができ、その中で Arg<sup>56</sup> の周りを酸性アミノ酸 Glu<sup>61</sup>, Glu<sup>65</sup>, Asp<sup>82</sup>, Glu<sup>99</sup> が取り囲んでいる。このような構造は分子表面の電荷分布に顕著に表れている(図 5.8)。 $S_3$ -RNase の HV 領域のループと  $\alpha$ 4-ヘリックスの間のクレフトには負電荷のクラスターが見られるが、 $S_{F11}$ -RNase では疎水性残基で表面が覆われ、クレフト自体存在しない(図 5.8)。HV 領域の表面電荷分布も  $S_3$ -RNase と  $S_{F11}$ -RNase では異なっている。 $S_3$ -RNase の HV 領域の分子表面には Lys<sup>51</sup>, Lys<sup>55</sup>, Lys<sup>58</sup> の正電荷や Glu<sup>57</sup> の負電荷が存在して、全体的に親水性であるが、 $S_{F11}$ -RNase の HV 領域はかなり疎水性である。この主な原因は、図 5.7 の 52–54 位に見られる疎水性アミノ酸のクラスターが分子表面に露出しているためである。

ナス科 S-RNase には HVa 領域以外の認識部位の候補として HVb 領域が存在している。実際、Matton らはポテト (*Solanum chacoense*)  $S_{11}$ -RNase の HVa 領域のアミノ酸配列を  $S_{13}$ -RNase のものに改変するだけでは不完全で、HVa および HVb 領域のアミノ酸配列をすべて  $S_{13}$ -RNase 型に改変して初めて  $S_{13}$  遺伝子型を示す形質転換体が得られることを示した[30]。このことは、ナス科 S-RNase では HVa と HVb 領域が共同して花粉側因子を認識することを示唆している。しかし、バラ科 S-RNase には HVb に相当する部分は数残基のアミノ酸が欠落しているため、 $S$  遺伝子型特異的なアミノ酸配列領域として特定できない(図 3.4, 5.7。便宜上 HVb' と呼ぶ)。HVb 領域は  $S_{F11}$ -RNase では  $\alpha$ 3-ヘリックスを形成している。 $\alpha$ 3-ヘリックスは HVa 領域の  $\alpha$ 2-ヘリックスと近接しており(主鎖間の最短距離で 6.9Å)、 $\alpha$ 2-ヘリックスの Asp<sup>(64)</sup> と  $\alpha$ 3-ヘリックスの Glu<sup>(74)</sup>, Arg<sup>(78)</sup> の側鎖が水分子 HOH<sup>(212)</sup> を介した水素結合で結ばれている。一方、 $S_3$ -RNase の HVb' 領域は  $S_{F11}$ -RNase のような  $\alpha$ -ヘリックスではなく非常に短い  $3_{10}$ -ヘリックスを形成している。 $S_{F11}$ -RNase に見られるような  $\alpha$ 2-,  $3_{10}$ -ヘリックスを連結している水分子は存在するが(水分子 HOH<sup>63</sup> を介して Glu<sup>65</sup>O, Arg<sup>74</sup>N<sup>H2</sup>, Asn<sup>77</sup>N<sup>δ2</sup> 間が水素結合可能)、 $3_{10}$ -ヘリックスの空間的な位置は  $S_{F11}$ -RNase の  $\alpha$ 3-ヘリックスより約 3Å ずれ、そのため HV 領域の  $\alpha$ 2-ヘリックスと  $3_{10}$ -ヘリックスの距離は  $S_{F11}$ -RNase の  $\alpha$ 2- $\alpha$ 3-ヘリックス間より約 1Å 離れている(図 5.6)。以上に述べた HVb', HVb 領域の立体構造の違いが両 S-RNase 環の最も顕著な立体構造の相違である。

$S_3$ -RNase の PS4 領域には、ナシ亜科 S-RNase にのみ見られる数残基のアミノ酸が

挿入している。この挿入は立体構造の差異に顕著に表れている。 $S_3$ -RNase の挿入部分 ( $\text{Glu}^{186}-\text{His}^{191}$ ) は  $S_{F11}$ -RNase には見られないループ構造をとって溶媒中に露出している。このループの分子表面は非常に疎水的で、自家不和合性に関与している花粉側の疎水的因素と結合するのかもしれない。

現時点では、2種類の S-RNase の立体構造しか決定されていないため  $S_3$ -RNase と  $S_{F11}$ -RNase の特徴がバラ科とナス科 S-RNase の特徴を代表しているとは結論できない。しかし、図 3.4 や 5.7 のアミノ酸配列の特徴を見る限りでは、 $S_3$ -RNase と  $S_{F11}$ -RNase はそれぞれの科を代表する立体構造をしている可能性が高い。バラ科とナス科の S-RNase は長い年月をかけて独立に進化したと考えられるので、上述の立体構造の相違はそれぞれの科の花粉側因子およびそれとの自他認識機構の差異を表現していると推測される。推測される花粉側因子との相互作用の差異は、1) 花粉側因子との結合に関して、バラ科では静電的相互作用、ナス科では疎水性相互作用の比率が高い、2) ナス科 S-RNase は HVa と HVb 領域が共同して花粉側因子を認識しているが、バラ科 S-RNase は HV 領域単独で認識している可能性が高い、3) PS4 領域はバラ科 (特にナシ亜科) 自家不和合性に特有な機能を果たしている可能性がある、の 3 点にまとめることができる。今後、さらに多くのバラ科およびナス科 S-RNase の立体構造が決定されれば、上記の推測がより確実なものになると思われる。

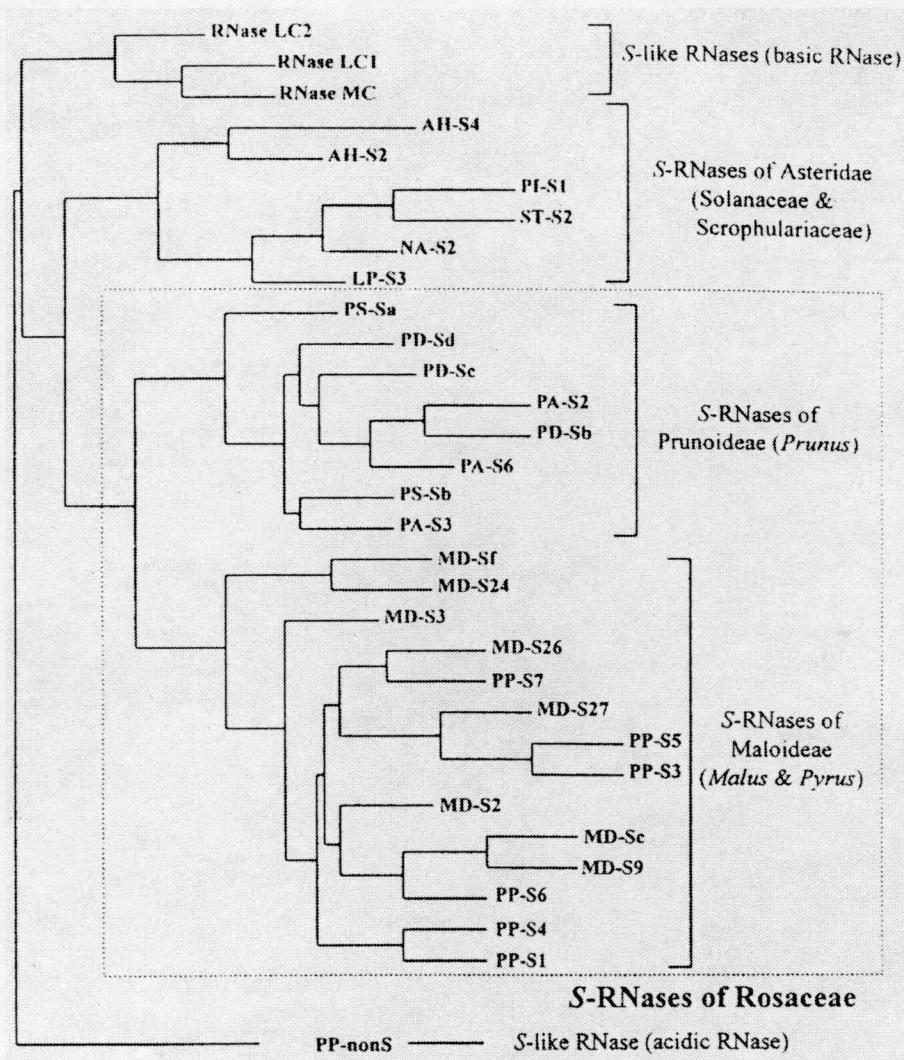


図 5.1: アミノ酸配列から構築された S-RNase の系統樹

[90] から引用。

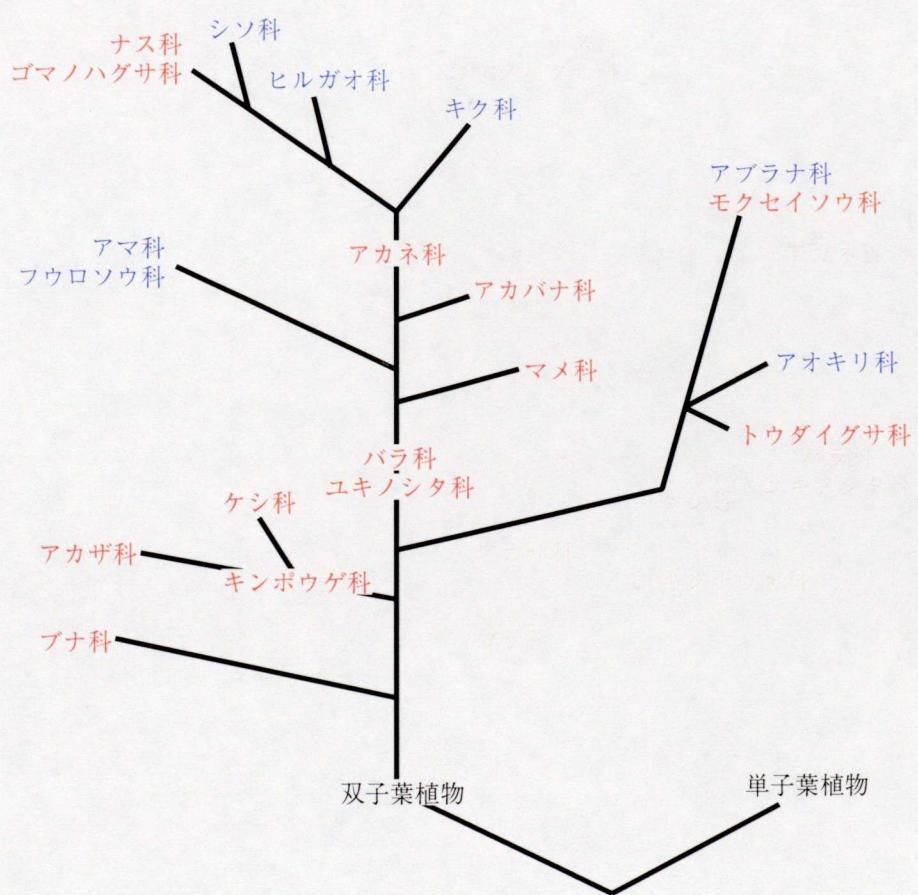


図 5.2: 双子葉植物の進化系統樹における自家不和合性の分布  
 赤は配偶体型自家不和合性, 青は胞子体型自家不和合性の科を示す。

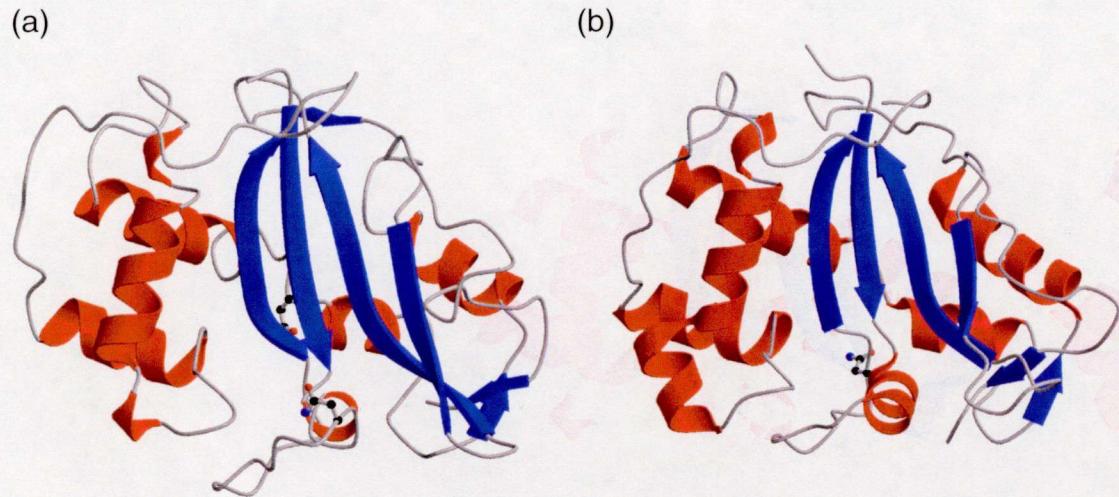


図 5.3: ニホンナシ  $S_3$ -RNase とタバコ  $S_{F11}$ -RNase の全体構造

(a) ニホンナシ  $S_3$ -RNase のリボンモデル。糖鎖結合部位である  $Asn^{18}, Asn^{116}$  を ball-and-stick で示した。 (b) タバコ  $S_{F11}$ -RNase のリボンモデル。糖鎖結合部位である  $Asn^{28}$  を ball-and-stick で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D* [85] で作成した。

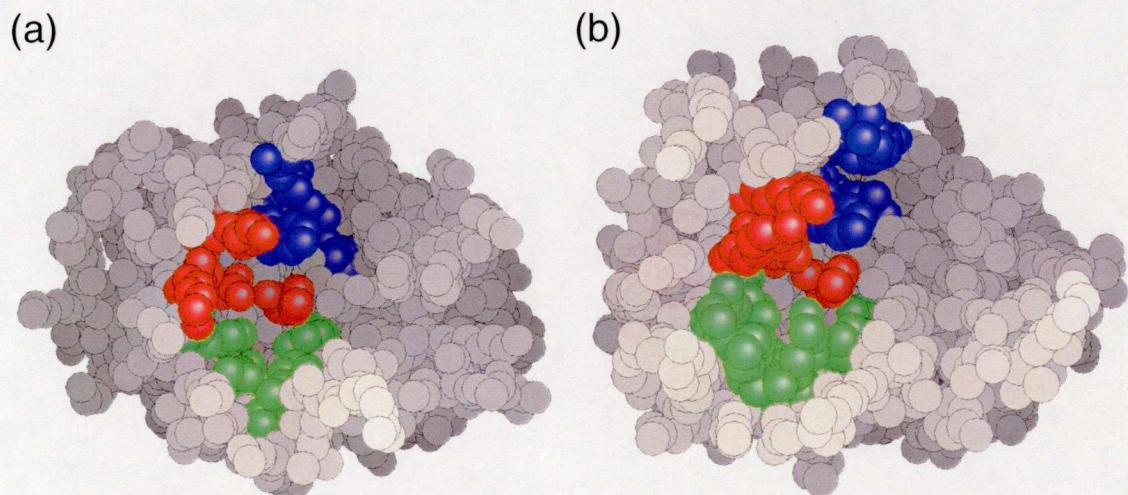
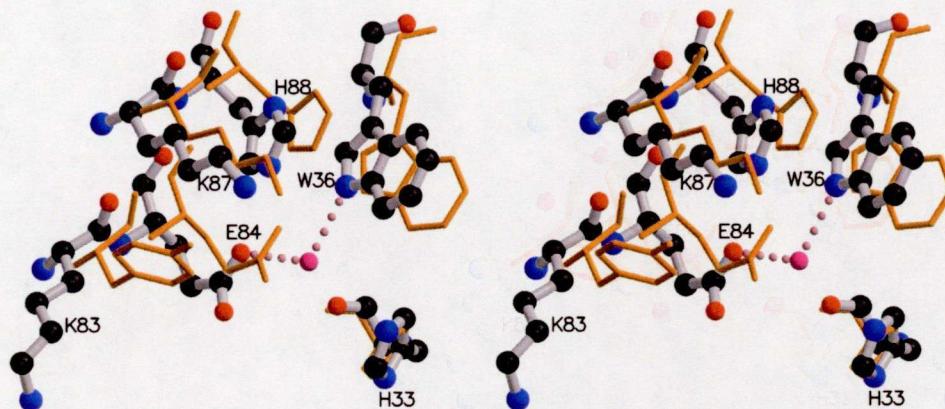


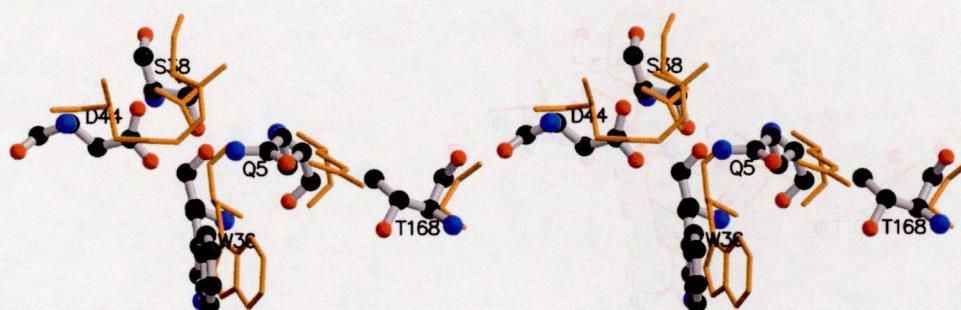
図 5.4: ニホンナシ  $S_3$ -RNase とタバコ  $S_{F11}$ -RNase の活性部位

(a) ニホンナシ  $S_3$ -RNase, (b) タバコ  $S_{F11}$ -RNase。 $P_1$  サイトのアミノ酸を赤,  $B_1$  サイトのアミノ酸を青,  $B_2$  サイトのアミノ酸を緑で示した。プログラム *GRASP* [86] で作成した。

(a)



(b)



(c)

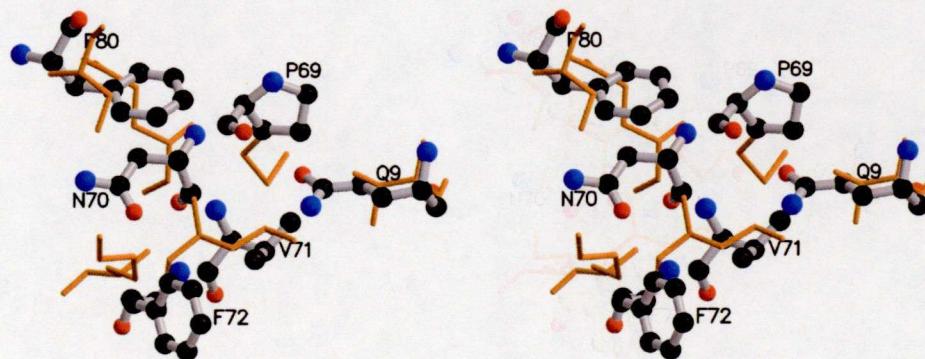


図 5.5: ニホンナシ  $S_3$ -RNase とタバコ  $S_{F11}$ -RNase の活性部位を構成するアミノ酸の立体配置 (ステレオ図)

(a) 触媒反応を行う  $P_1$  サイト, (b) 基質塩基と結合する  $B_1$  サイト, (c) 基質塩基と結合する  $B_2$  サイト。 $P_1$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  の名称は RNase A の例 [80] に倣った。ニホンナシ  $S_3$ -RNase のアミノ酸は ball-and-stick, タバコ  $S_{F11}$ -RNase のアミノ酸は橙で示した。両者の立体構造はプログラム DEJAVU [83] で重ね合わせた。プログラム MOLSCRIPT [84] と RASTER3D [85] で作成した。

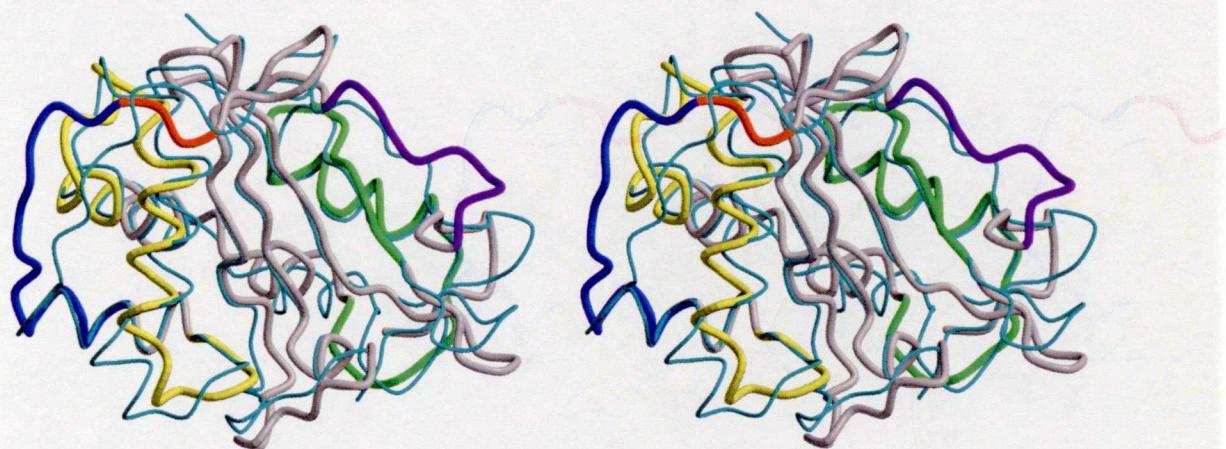


図 5.6: ニホンナシ  $S_3$ -RNase とタバコ  $S_{F11}$ -RNase の立体構造の重ね合わせ (ステレオ図)  
図 3.4 と同様に HV を青, PS1 を青と赤, PS2 を黄, PS3 を緑, PS4 を紫で示した。タバコ  $S_{F11}$ -RNase は水色で示した。プログラム *MOLSCRIPT* [84] と *RASTER3D* [85] で作成した。

			HV (HVa)	HVb' (HVb)	PS4
<i>P.pyrifolia</i>	S3	SKC-P-IKNIRK--REK-L--LEHQ	D-RTKN---NL	CPHPFEPISP	
	S5	SNC-P-IRNIRK--REK-L--LEPQ	D-RTKN---KL	CPHPFEPISP	
	S1	EKC-K-TTALNSQK-IG-N--MTAQ	N-RSDH---VG	CPHGPPQGSR	
	S2	EYC-K-TKRYRK--IQ-R--LEPQ	D-RKAN---RG	CPRPLPQASP	
	S4	EKC-K-TTTMNSQK-IG-N--MTAQ	N-RSDH---VG	CPHGPPKGSR	
	S6	IYC-K-NKTIKSQQ-IG-N--LTAQ	D-RTDH---VG	CPRSSFKGSP	
	S7	ENC-T-NATVNPHR-IK-N--IQAQ	D-RTNH---VG	CPHPPP-GSP	
<i>M.domestica</i>	S2	FNC-S-SSNVTYAK-IQ-N--IRTQ	N-RKNH---LG	CPHHPNGSR	
	S3	KKC-K-TTILNPQT-IT-N--LTAQ	N-RKAH---AR	CPRPFPQGSP	
	S7	VNC-S-KSTVDAQK-LG-N--LTTQ	N-RTDH---IS	CPRHIPNGSR	
	S9	IYC-K-NTTMNSTK-IA-N--LTAR	D-RTDH---IT	CPRPILNGSR	
	S24	KYC-N-AQQYQT---MK-I--LEPQ	N-RNDH---EG	CPRPFPGRSR	
	S26	KYC-N-PSNVTSHM-LK-N--IQAQ	N-RTDH---IG	CPSPILPGSP	
	S27	ESC-K-IRNHRT--RAK-A--LEPQ	D-RTNH---TA	CPNPFPQGSP	
<i>M.transifolia</i>	Sf	EYC-K-APPYHT---IK-M--LEPQ	N-RNDH---EG	CPRPFPQGSR	
	Si	KKC-K-ATILNPQT-IT-N--LKAQ	N-RRAH---VR	CPNPFPQGSP	
	St	SKC-P-IKNIRK--REK-L--LEHQ	D-RTKN---NL	CPHPFEPISP	
<i>P.ussuriensis</i>	KT1	VNC-T-NKTMNSLT-MG-N--LTAQ	N-RNDH---AG	CPRPFPQGSP	
	KT2	EYC-R-TRNRRK--RAK-K--LEPQ	D-RTNH---TG	CPNPFLPGSP	
<i>N.alata</i>	S1	NY-CDRQK-KFKL--FED-D-KKQND	LDRDDCKNGQG	CPRPK-----	
	S2	NY-CDESK-PYNM--FTD-G-KKKND	KTKFDSDLQKA	CPNPK-----	
<i>P.inflata</i>	SF11	HN-CKPKP-TYSY--FTG-K--MLND	FEQDYGRTEQP	CPQSD-----	
	S1	EF-CTGDP-KYET--FKD-N-NIVDY	FDENYAKYHQP	CHHSY-----	
	S2	EF-CTGDP-KYSR--FKE-D-NIINV	FDEKYASTKQP	CRHSK-----	
<i>S.chacoense</i>	S3	EF-CDGDK-FVSF--SLK-D-RIVND	FDEKFAKIKQP	CRHSN-----	
	S2	NN-C-RSY-AYNA--LTN-V-REQSK	SNKSMTMKEQK	CHRPW-----	
	S3	NF-CKIVK--YNK---IEDEHKIDA	TTEAVSKEDQV	CPRPK-----	
<i>L.esculentum</i>	S6	HD-CDVPP-EVDY--VQIEDHKILNA	YDYWYGIDKQY	CPRRW-----	
	S3	IN-CPAKE-SYKS--ITDKH--LLNK	SNQGS---AE	CRRRW-----	
<i>L.peruvianum</i>	S7	YD-CNPNK-EFKK--IYDKH--LLNK	SHEYAGLNDQT	CPRNS-----	

図 5.7: バラ科およびナス科 S-RNsae の HV (HVa), HVb' (HVb), PS4 領域のアミノ酸配列アライメント

*P.pyrifolia*: ニホンナシ, *M.domestica*: リンゴ, *M.transifolia*: リンゴ野生種, *P.ussuriensis*: チュウゴクナシ, *N.alata*: タバコ, *P.inflata*: ペチュニア, *S.chacoense*: ポテト, *L.esculentum*, *L.peruvianum*: トマト

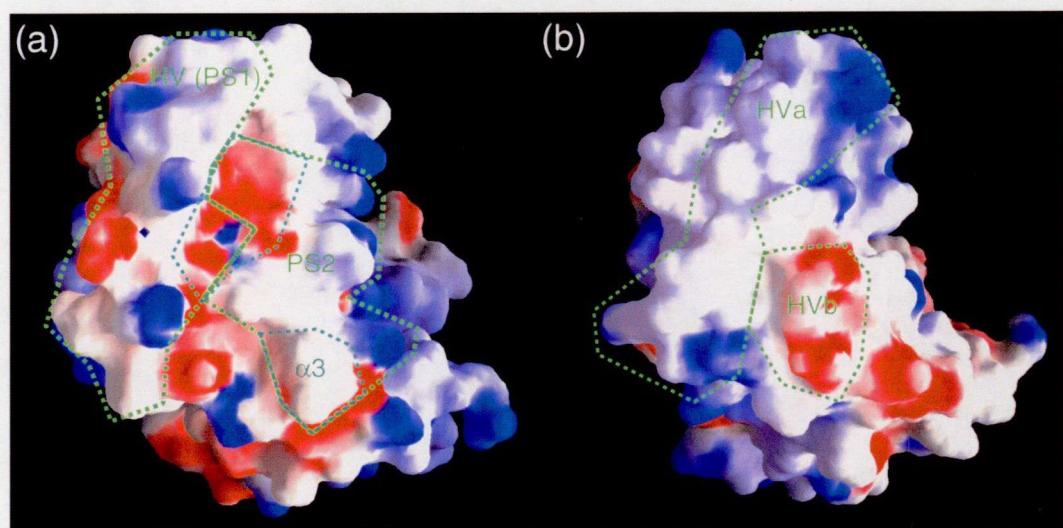


図 5.8: PS1 (HV), PS2 領域の表面電荷

(a) ニホンナシ S<sub>3</sub>-RNase, (b) タバコ S<sub>F11</sub>-RNase。表面電荷は  $-10$  から  $+10 k_B T$  の範囲で負電荷を赤、正電荷を青で示した。水色の点線で囲んだ部分はクレフトを示した。プログラム GRASP [86] で作成した。

## 第 6 章

### 結論

ナス科タバコで配偶体型自家不和合性因子である S-RNase が発見されたのは 1986 年であり、それ以来 S-RNase を中心に配偶体型自家不和合性の研究がなされてきた。しかし、S-RNase と相互作用して自他認識を行っている花粉側 *S* 遺伝子産物は未だに発見されず、その分子機構は殆ど解明されていない。本研究において、放射光 X 線結晶構造解析によりバラ科ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を決定したが、これは世界で初めての業績であり、配偶体型自家不和合性の分子機構を構造生物学的視点から議論する礎を築いたと言える。

本論文の第 2 章では、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の精製および結晶化について述べた。ニホンナシ雌しべには非常に強いフェノールオキシダーゼ活性があり、S-RNase の精製過程で多量のポリフェノールが生成する。このポリフェノールは蛋白質に吸着して変性・沈澱させるため、S-RNase の収量が著しく低くなる。この問題は、ポリフェノールの生成を抑制するアスコルビン酸と生成したポリフェノールを吸着するポリクラー AT を抽出液に加えることで克服し、5,000 花分から 5mg の収量で S-RNase を精製できる方法を確立した。S-RNase は糖蛋白質であるため結晶化が難しいと考えられた。そこで、7 種類のニホンナシ S-RNase のなかでも糖鎖がもっとも少ない  $S_3$ -RNase に焦点を絞って結晶化を試みた。また、 $S_3$ -RNase には、アミノ酸配列の相同性が極めて高いアイソフォーム ( $S_5$ -RNase) が存在する点でも注目に値した。種々の結晶化条件を検討した結果、 $0.1 \times 0.1 \times 0.03$  mm の結晶を得ることができた。

第 3 章では、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造について記述した。当初、ニホンナシ

$S_3$ -RNase と同じく RNase T<sub>2</sub> ファミリーに属するニガウリ種子由来の RNase MC1 をモデル分子とした分子置換法による立体構造の解明を試みたが、得られた解が真であると断定することはできなかった。そこで、多重同型置換法による解析を行い、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を 1.5 Å 分解能で明らかにした。また、得られたニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造を立体構造既知の RNase T<sub>2</sub> 酵素と比較し、全体構造、活性部位、HV 領域および PS 領域の立体構造について、S-RNase 特有な構造を考察した。この結果、(1) 活性部位の立体構造は自家不和合性に関与しない RNase T<sub>2</sub> 型酵素とほとんど同じである、(2) HV 領域は弱い塩基性で分子表面に露出している、(3) 4 か所の PS 領域は活性部位を挟むようにして分子表面に露出している、(4) HV および PS 領域の立体構造は自家不和合性に関与しない RNase T<sub>2</sub> 型酵素と異なっている、という知見が得られた。これらの知見は、分子生物学的や植物生理学的方法あるいは S-RNase のアミノ酸配列からでは解明されなかつたものである。

第 4 章では、第 3 章で立体構造を決定したニホンナシ  $S_3$ -RNase と 95.5% のアミノ酸配列の相同性があるニホンナシ  $S_5$ -RNase および 95.5% の相同性があるリンゴ  $S_t$ -RNase について、アミノ酸置換とエネルギーの最小化で立体構造を予測し、 $S_3$ -RNase と詳細に比較した。その結果、予測された構造は  $S_3$ -RNase とほとんど変化せず、花粉側因子は  $S_3$ -RNase と  $S_5$ -RNase ( $S_t$ -RNase) 間のアミノ酸変異の部分のみを微視的に認識している可能性が示唆された。

第 5 章では、ニホンナシ  $S_3$ -RNase の立体構造と、ほぼ同時期に発表されたナス科タバコ  $S_{F11}$ -RNase の立体構造を比較し、バラ科とナス科の配偶体型自家不和合性の違いを議論した。その結果、(1) バラ科は静電的、ナス科は疎水的に花粉側 S 遺伝子産物と相互作用している可能性が示唆された、(2) ナス科 S-RNase は HVa と HVb 領域が共同して花粉側因子を認識しているが、バラ科は HV 領域単独で認識している可能性が高い、(3) 自家不和合性において PS4 領域はナス科には見られないバラ科特有な機能を果たしている可能性がある、を指摘することができた。

最後に、本研究で決定された  $S_3$ -RNase の立体構造を基に配偶体型自家不和合性の分子機構モデルを検証する。立体構造から予測される花粉側 S 遺伝子産物とはいかなるものであろうか。HV 領域や PS 領域は、今までに知られている DNA あるいは RNA 結合ドメイン

ンに該当せず [91]、その分子表面にも RNA 結合蛋白質やペクチン結合蛋白質に見られる広範囲な正あるいは負電荷のクラスターは見い出せなかった。よって、花粉側因子がこれらの部分と結合するならば、花粉側因子も蛋白質である可能性が高い。しかし、今までに知られている蛋白質間認識ドメイン(抗体, MHC, EGF 様フォールド, インスリン様フォールド, シスチンノットフォールド, TNF 様フォールド,  $\beta$ -トレフォイルフォールド, 4 本ヘリックスバンドルフォールド, IL-8 様ケモカインフォールド, SH2 ドメイン, SH3 ドメイン, PH ドメイン, PTB ドメイン, PDZ ドメインなど)にも該当しないため [91]、新規な分子認識機構であると考えられる。

概要で述べたように、配偶体型自家不和合性のモデルとしてレセプター説とインヒビター説が提唱されているが、Luu らの報告 [44] 以来、インヒビター説がより有力とされている。彼らは、S 遺伝子型が異なるすべての S-RNase の活性を阻害するインヒビターが花粉側 S 遺伝子産物であるとする説を改良して、RNase T<sub>2</sub> 型酵素を阻害するユニバーサルなインヒビターの存在を予言した。そして、花粉側 S 遺伝子産物は認識部位に結合する機能のみをもち、この結合によってユニバーサルなインヒビターと S-RNase の結合が阻害され、結果として異なる S 遺伝子型の S-RNase の活性が阻害されることになる(図 6.1, [92])。本論文で明らかにした S-RNase の分子構造から得られた知見より、RNase 活性部位は認識領域として最も可能性の高い His<sup>62</sup> 近傍と直線距離(活性に必須の His<sup>33</sup>C<sup>α</sup> と 62 位近傍アミノ酸の C<sup>α</sup> との距離)で 12Å 以上離れており、空間配置で約 90° 異なる位置に存在する。もし、ユニバーサルなインヒビターの存在を仮定すると、この分子は活性部位と認識部位を覆うことができるかなり巨大な分子であると考えられる。一方、認識部位のみに結合する花粉側 S 遺伝子産物も HV 領域と PS2 領域前半をすべて認識するには、この距離が約 10Å であるから、この因子もかなり大きな分子と思われる。しかし、His<sup>62</sup> 近傍のみを認識するのであれば、ペプチドのような分子も考慮に入れなければならない。さらに言えることは、ユニバーサルなインヒビターより花粉側 S 遺伝子産物のほうが S-RNase により強く結合(解離定数 K<sub>d</sub> がより小さい)しなければならないことである。

配偶体型自家不和合性の分子機構に関する理解がすべてにおいて推測の域を出ないのは、多くの研究者の長年の努力にもかかわらず、花粉側 S 遺伝子産物が見つからないためである。今後、上述した S-RNase の立体構造から予測される花粉側 S 遺伝子産物の知見

を基に、この因子の発見に全力を尽くさなければならない。

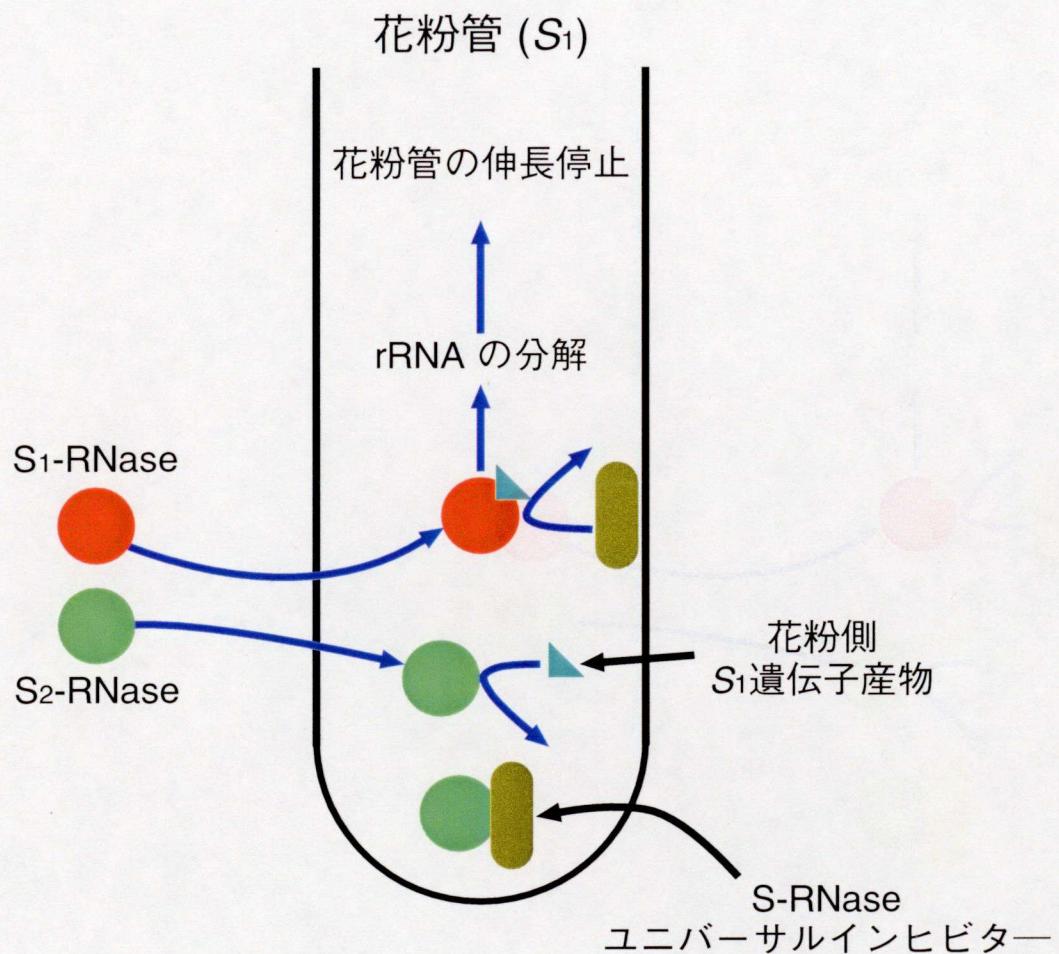


図 6.1: Luu らが提唱するモデル

# 参考文献

- [1] Newbigin, E., Anderson, M. A., Clarke, A. E., Gametophytic self-incompatibility systems, *Plant Cell* **5** (10) (1993) 1315–1324.
- [2] de Nettancourt, D., Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2001.
- [3] Darwin, C. R., On the Origin of Species, John Murray, London, UK, 1859.
- [4] Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., Isogai, A., The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (4) (2000) 1920–1925.
- [5] Schopfer, C., Nasrallah, M., J.B., N., The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*, *Science* **286** (5445) (1999) 1697–1700.
- [6] Brugié re, N., Cui, Y., Rothstein, S. J., Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility, *Trends Plant Sci.* **5** (10) (2000) 432–438.
- [7] de Nettancourt, D., Incompatibility in Angiosperms, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1977.
- [8] Anderson, M., Cornish, E., Mau, S.-L., E.G., W., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P., Haley, J., Penschow, J., Niall, H., Tregear, G., Coghlan, J., Crawford, R., Clarke, A., Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*, *Nature* **321** (1986) 38–44.
- [9] Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F., Kyogoku, Y., Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*, *Eur. J. Biochem.* **187** (1) (1990) 255–262.

- [10] McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., Clarke, A. E., Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases, *Nature* **342** (1989) 955–957.
- [11] Ai, Y., Singh, A., Coleman, C., Loerger, T., Kheyr-Pour, A., Kao, T.-H., Self-incompatibility in *Petunia inflata*: isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associates proteins, *Sex. Plant Reprod.* **3** (1990) 130–138.
- [12] Y.J., A., E., K., T-H, K., S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*, mcclure-1989-nature **230** (3) (1991) 353–358.
- [13] Tsai, D.-S., Lee, H.-S., Post, L., Kreling, K., Kao, T.-H., Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins, *Sex. Plant Reprod.* **5** (1992) 256–263.
- [14] Norioka, N., Ohnishi, Y., Norioka, S., Ishimizu, T., Nakanishi, T., Sakiyama, F., Nucleotide Sequences of cDNAs Encoding S2- and S4-RNases (D49527 and D49528 for EMBL) from Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai 1), *Plant Physiol.* **108** (3) (1995) 1343.
- [15] Ishimizu, T., Shinkawa, T., Sakiyama, F., Norioka, S., Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility, *Plant Mol. Biol.* **37** (6) (1998) 931–941.
- [16] Tomimoto, Y., Nakazaki, T., Ikehashi, H., Ueno, H., Hayashi, R., Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*, *Scientia Horticulturae* **66** (3–4) (1996) 159–167.
- [17] Janssens, G., Broekaert, W., Broothaerts, W., Proost, P., cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple, *Plant Mol. Biol.* **27** (3) (1995) 499–511.
- [18] Janssens, G., Goderis, I., Broekaert, W., Broothaerts, W., A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR, *Theor. Appl. Genet.* **91** (1995) 691–698.
- [19] Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H., Self-

- incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T<sub>2</sub>/S ribonuclease superfamily, Mol. Gen. Genet. **250** (5) (1996) 547–557.
- [20] Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Hirano, H., Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae, Mol. Gen. Genet. **260** (2–3) (1998) 261–268.
- [21] Lee, H. S., Huang, S., Kao, T.-H., S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*, Nature **367** (6463) (1994) 560–563.
- [22] Murfett, J., Atherton, T. L., Beiquan, M., Gasser, C. S., McClure, B. A., S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen refection, Nature **367** (6463) (1994) 563–566.
- [23] Huang, S., Lee, H. S., Karunananadaa, B., Kao, T.-H., Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen, Plant Cell **6** (7) (1994) 1021–1028.
- [24] McCubbin, A. G., Chung, Y. Y., Kao, T.-H., A Mutant S<sub>3</sub>-RNase of *Petunia inflata* Lacking RNase Activity Has an Allele-Specific Dominant Negative Effect on Self-Incompatibility Interactions, Plant Cell **9** (1) (1997) 85–95.
- [25] Karunananadaa, B., Huang, S., Kao, T.-H., Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil, Plant Cell **6** (12) (1994) 1933–1940.
- [26] Foote, H. C. C., Ride, J. P., Franklin-Tong, V. E., Walker, E. A., Lawrence, M. J., Franklin, F. C. H., Cloning and Expression of a Distinctive Class of Self-Incompatibility (S) Gene from *Papaver rhoesas* L, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (6) (1994) 2265–2269.
- [27] Irie, M., Structure-Function Relationships of Acid Ribonucleases; Lysosomal, Vacuolar, and Periplasmic Enzymes, Pharmacol. Ther. **81** (2) (1999) 77–89.
- [28] Richman, A. D., Broothaerts, W., Kohn, J. R., Self-incompatibility RNases from three plant families: homology or convergence?, Am. J. Bot. **84** (7) (1997) 912–917.
- [29] Kao, T.-H., McCubbin, A. G., How flowering plants discriminate between self and non-

- self pollen to prevent inbreeding, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (22) (1996) 12059–12065.
- [30] Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., Cappadocia, M., Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNase Mediate Allele-Specific Pollen Recognition, Plant Cell **9** (10) (1997) 1757–1768.
- [31] Matton, D. P., Luu, D. T., Xike, Q., Laublin, G., O'Brien, M., Maes, O., Morse, D., Cappadocia, M., Production of an S RNase with Dual Specificity Suggests a Novel Hypothesis for the Generation of New S Alleles, Plant Cell **11** (11) (1999) 2087–2097.
- [32] Norioka, N., Norioka, S., Ohnishi, T., Ishimizu, T., Oneyama, C., Nakanishi, T., Sakiyama, F., Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility, J. Biochem. **120** (2) (1996) 335–345.
- [33] Ishimizu, T., Endo, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Nakamura, K., Sakiyama, F., Norioka, S., Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: Implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase, FEBS Lettr. **440** (3) (1998) 337–342.
- [34] Hughes, A. L., Nei, M., Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection, Nature **335** (6186) (1988) 167–170.
- [35] Hughes, A. L., Nei, M., Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (3) (1989) 958–962.
- [36] Endo, T., Ikeo, K., Gojobori, T., Large-Scale Search for Genes on Which Positive Selection May Operate, Mol. Biol. Evol. **13** (5) (1996) 685–690.
- [37] McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., Clarke, A. E., Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA, Nature **347** (6295) (1990) 757–760.
- [38] Mascarenhas, J. P., Gene activity during pollen development, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **41** (1990) 317–338.
- [39] Mascarenhas, J. P., Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation,

- Plant Cell **5** (10) (1993) 1303–1314.
- [40] Dodds, P. N., Clarke, A. E., Newbigin, E., A Molecular Perspective on Pollination in Flowering Plants, *Cell* **85** (1) (1996) 141–144.
- [41] Golz1, J. F., Su, V., Clarke, A. E., Newbigin, E., A Molecular Description of Mutations Affecting the Pollen Component of the *Nicotiana alata* *S* locus, *Genetics* **152** (3) (1999) 1123–1135.
- [42] Chawla, B., Bernatzky, R., W., L., Marcotrigiano, M., Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum*: Inheritance and expression of *S*-related proteins, *Theor. Appl. Genet.* **95** (5/6) (1997) 992–996.
- [43] Entani, T., Takayama, S., Iwano, M., Shiba, H., Che, F. S., Isogai, A., Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** (11) (1999) 1882–1888.
- [44] Luu, D. T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M., S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility, *Nature* **407** (6804) (2000) 649–651.
- [45] Ishimizu, T., Sato, Y., Saito, T., Yoshimura, Y., Norioka, S., Nakanshi, T., Sakiyama, F., Identification and Partial Amino Acid Sequences of Seven S-RNases Associated with Self-Incompatibility of Japanese Pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai, *J. Biochem.* **120** (2) (1996) 326–334.
- [46] Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Miyagi, M., Shinkawa, T., Natsuka, S., Hase, S., Sakiyama, F., Norioka, S., Presence of asparagine-linked *N*-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility, *Eur. J. Biochem.* **263** (3) (1999) 624–634.
- [47] Terami, H., Torikata, H., Shimazu, Y., Analysis of the sterility- factors existing in varieties of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.), *Studies Hort. Inst. Kyoto. Imp. Univ.* **3** (1946) 267–271, (in Japanese with English abstract).
- [48] Otwinowski, Z., Minor, W., Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* **276** (1997) 307–326.
- [49] Collaborative Computational Project, N. ., The CCP4 suite: programs for protein crys-

- tallography, *Acta. Cryst. D50* (5) (1994) 760–763.
- [50] Mathews, B. W., Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.* **33** (2) (1968) 491–497.
- [51] Matsuura, T., Unno, M., Sakai, H., Tsukihara, T., Norioka, S., Purification and crystallization of Japanese pear S-RNase associated with gametophytic self-incompatibility, *Acta Crystallographica D57* (1) (2001) 172–173.
- [52] Leslie, A. G. W., Joint CCP4 and ESF\_EAMBC Newsletter on Protein Crystallography, Tech. Rep. 26, SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK (1992).
- [53] Ota, M., Nishikawa, K., Assessment of pseudo-energy potentials by the best-five test: a new use of the three-dimensional profiles of proteins, *Prot. Eng.* **10** (4) (1997) 339–351. URL [http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/libra/LIBRA\\_I.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/libra/LIBRA_I.html)
- [54] Nakagawa, A., Tanaka, I., Sakai, R., Nakashima, T., Funatsu, G., Kimura, M., Crystal structure of a ribonuclease from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*) at 1.75 Å resolution, *Biochim. Biophys. Acta* **1433** (1–2) (1999) 253–260.
- [55] Brünger, A. T., X-PLOR, Version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, CT, USA, 1993.
- [56] Navaza, J., *AMoRe*: an automated package for molecular replacement, *Acta. Cryst. A50* (2) (1994) 157–163.
- [57] Vagin, A., Teplyakov, A., *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement, *J. Appl. Cryst.* **30** (6) (1997) 1022–1025.
- [58] Terwilliger, T. C., Berendzen, J., Automated MAD and MIR structure solution, *Acta Cryst. D55* (4) (1999) 849–861.
- [59] de La Fortelle, E., Bricogne, G., Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods, *Methods Enzymol.* **276** (1997) 472–493.
- [60] Perrakis, A., Sixma, T. K., Wilson, K. S., Lamzin, V. S., *wARP*: Improvement and Extension of Crystallographic Phases by Weighted Averaging of Multiple-Refined Dummy Atomic Models, *Acta Cryst. D53* (4) (1997) 448–445.

- [61] Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M., Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Cryst. A* **47** (2) (1991) 110–119.
- [62] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., GrosseKunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L., *Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination*, *Acta. Cryst. D* **54** (5) (1998) 905–921.
- [63] Kleywegt, G. J., Jones, T. A., Databases in Protein Crystallography, *Acta. Cryst. D* **54** (6) (1998) 1119–1131.  
URL <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>
- [64] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst. D* **26** (2) (1993) 283–291.
- [65] Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I., P.E., B., The Protein Data Bank, *Nucl. Acids. Res.* **28** (1) (2000) 235–242.  
URL <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [66] Kurihara, H., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M., Mizuno, H., Nakamura, K. T., Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*, *FEBS Lett.* **306** (2,3) (1992) 189–192.
- [67] Kurihara, H., Nonaka, T., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M., Nakamura, K. T., The Crystal Structure of Ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 Å Resolution, *J. Mol. Biol.* **255** (2) (1996) 310–320.
- [68] Tanaka, N., Arai, J., Inokuchi, N., Koyama, T., Ohgi, K., Irie, M., Nakamura, K. T., Crystal Structure of a Plant Ribonuclease, RNase LE, *J. Mol. Biol.* **298** (5) (2000) 859–873.
- [69] Ishimizu, T., Norioka, S. and Kanai, M., Clarke, A. E., Sakiyama, F., Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gametophytic self-incompatibility, *Eur. J. Biochem.* **242** (2) (1996) 627–635.

- [70] Oxley, D., Bacic, A., Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana alata*, *Eur. J. Biochem.* **242** (1) (1996) 75–80.
- [71] Sanda, A., Irie, M., Chemical modification of tryptophan residues in ribonuclease from a *Rhizopus* sp., *J. Biochem.* **87** (4) (1980) 1079–1087.
- [72] Sanda, A., Takizawa, Y., Irie, M., Carboxymethylation of a Ribonuclease from *Rhizopus* sp., *Chem. Pharm. Bull.* **33** (10) (1985) 4515–4521.
- [73] Sanda, A., Takizawa, Y., Iwama, M., Irie, M., Modification of a ribonuclease from *Rhizopus* sp. with 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)carbodiimide p-toluenesulfonate., *J. Biochem.* **98** (1) (1985) 125–132.
- [74] Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Takagi, M., Yano, K., Irie, M., Expression of RNase Rh from *Rhizopus niveus* in yeast and characterization of the secreted proteins, *J. Biochem.* **109** (5) (1991) 776–785.
- [75] Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., Irie, M., Evidence that three histidine residues of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Rhizopus niveus* are involved in the catalytic function, *J. Biochem.* **112** (1) (1992) 132–138.
- [76] Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., Irie, M., Role of Asp51 and Glu105 in the enzymatic activity of a ribonuclease from *Rhizopus niveus*, *J. Biochem.* **113** (2) (1993) 219–224.
- [77] Ohgi, K., Iwama, M., Tada, K., Takizawa, R., Irie, M., Role of Lys108 in the enzymatic activity of RNase Rh from *Rhizopus niveus*, *J. Biochem.* **117** (1) (1995) 27–33.
- [78] Ohgi, K., Iwama, M., Ogawa, Y., Hagiwara, C., Ono, E., Kawaguchi, R., Kanazawa, C., Irie, M., Enzymatic activities of several K108 mutants of ribonuclease (RNase) Rh isolated from *Rhizopus niveus*, *Biol. Pharm. Bull.* **19** (1996) 1080–1082.
- [79] Ohgi, K., Shiratori, Y., Nakajima, A., M., I., Kobayashi, H., Inokuchi, N., Koyama, T., Kock, M., Loffler, A., Glund, K., Irie, M., The base specificities of tomato ribonuclease (RNase LE) and its Asp44 mutant enzyme expressed from yeast cells, *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (3) (1997) 432–438.

- [80] Richards, F. M., Wyckoff, H. W., *The Enzymes*, Vol. 4, Academic Press, New York, USA, 1971.
- [81] Lee, Y. H., Ota, T., Vacquier, V. D., Positive Selection Is a General Phenomenon in the Evolution of Abalone Sperm Lysin, *Mol. Biol. Evol.* **12** (2) (1995) 231–238.
- [82] Branden, C. I., Tooze, J., *Introduction to Protein Structure*, 2nd Edition, Garland Publishing, New York, USA, 1999.
- [83] Kleywegt, G. J., Jones, T. A., Detecting folding motifs and similarities in protein structures, *Methods Enzymol.* **277** (1997) 525–545.
- [84] Kraulis, P. J., *MOLSCRIPT*: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **24** (5) (1999) 946–950.
- [85] Merrit, E. A., Murphy, M. E. P., *Raster3D* Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics, *Acta Crystallogr.* **D50** (6) (1994) 869–873.
- [86] Nicholls, A., Sharp, K. A., Honig, B., Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Protein: Struct. Funct. Genet.* **11** (4) (1991) 281–296.
- [87] Kabsch, W., Sander, C., Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* **22** (1983) 2577–2637.
- [88] Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., Norioka, S., Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility, *J. Biol. Chem.* **276** (48) (2001) 45261–45269.
- [89] Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A. E., Sakiyama, F., M., S., The 1.55 Å Resolution Structure of *Nicotiana alata* S<sub>F11</sub>-RNase Associated with Gametophytic Self-incompatibility, *J. Mol. Biol.* **314** (1) (2001) 103–112.
- [90] Yamane, H., T. R. S. A., Identification of cDNA Cloning for S-RNase in Self-incompatible Japanese Plum (*Prunus saliciana* Lindl. cv. Sordum, Plant Biotechnology (Tokyo) **16** (5) (1999) 389–396.
- [91] Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Inagaki, F., Morikawa, K. (Eds.), 構造生物学のフロン

ティアーシグナル伝達と DNA トランスアクション, 共立出版, 東京, 1999.

- [92] Luu, D. T., Qin, X., Laublin, G., Yang, Q., Morse, D., Cappadocia, M., Rejection of S-Heteroallelic Pollen by a Dual-Specific S-RNase in *Solanum chacoense* Predicts a Multimeric SI Pollen Component, *Genetics* **159** (1) (2001) 329–335.

# 研究成果の発表

1. Expression system of *Pyrus pyrifolia* S-RNase in *E. coli* and its application to screening of pollen S-gene product(s)

Gamage, N., Matsuura, T., Norioka, N., Yoshimura, Y., Nakanishi, T., Norioka, S.  
*Pollen-Stigma Interactions* (Oxford, United Kingdom, Jun., 1999)

2. 中国ナシ「キンツイイリー」における自家不和合性の分子的解析

松浦 孝範, 乗岡 尚子, 奥畑 智子, 石水 育, 吉村 由美, 李 紹良, 下中 雅仁, 井上 耕介,  
 崎山 文夫, 乗岡 茂巳  
 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜, 1999 年 10 月)

3. 自家不和合性因子 S-RNase の大腸菌における発現系の構築

GAMAGE Niranjali, 松浦 孝範, 乗岡 尚子, 吉村 由美, 中西 テツ, 乗岡 茂巳  
 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜, 1999 年 10 月)

4. Expression of a fusion protein of *Pyrus pyrifolia* S-RNase with glutathione-S-transferase in *E. coli*

Gamage, N., Matsuura, T., Norioka, N., Yoshimura, Y., Takasaki, T., Nakanishi, T.,  
 Norioka, S.  
*Biotechnology Letters* **22**, 1413–1417 (2000)

5. Purification and crystallization of Japanese pear S-RNase associated with gametophytic self-incompatibility

Matsuura, T., Unno, M., Sakai, H., Tsukihara, T., Norioka, S.  
*Acta Crystallographica D57*, 172–173 (2001)

6. バラ科配偶体型自家不和合性因子 S3-RNase の 1.5Å 分解能 X 線結晶構造解析

松浦 孝範, 酒井 宏明, 海野 昌喜, 崎山 文夫, 乗岡 茂巳

## 第 1 回 日本蛋白質科学会年会 (大阪, 2001 年 6 月)

7. Molecular Cloning of cDNAs Encoding S-RNases-like Proteins from Self-incompatible Chinese pear 'Ya-Li' and Its Compatible Mutant 'Kintsui li'

Norioka, N., Okuhata, S., Matsuura, T., Li, S.L., Tabira, H., Inoue, K., Sakiyama, F., Norioka, S.

*International Symposium on Asian Pears* (Tottori, Japan, Aug. 2001)

8. 自家不和合性因子 S-RNase による花粉リボソーム分解活性の解析

瀬崎 浩史, 松浦 孝範, GAMAGE Niranjali, 乗岡 尚子, 乗岡 茂巳

第 74 回 日本生化学会大会 (京都, 2001 年 10 月)

9. Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility

Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., Norioka, S.

*J. Biol. Chem.* **276**, 45261–45269 (2001)

