



Title	配偶体型自家不和合性とS-RNaseとの関連性
Author(s)	乗岡, 尚子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128847
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

自家不適合性とS-RNaseとの関連性

大阪大学蛋白質研究所
化学構造部門
乗岡尚子

配偶体型自家不和合性とS-RNaseとの関連性



1997年 1月31日

大阪大学蛋白質研究所

化学構造部門

乗岡尚子

目次

第一章 緒言	1
第二章 ニホンナシ二十世紀花柱リボヌクレアーゼcDNAのクローニング	
序論	8
実験材料と実験方法	9
結果	12
考察	22
第三章 Non-S-RNase、S2-RNase、S4-RNaseのmRNAのノーザン分析	
序論	33
実験材料と実験方法	34
結果と考察	36
第四章 二十世紀S2-RNase、S4-RNaseのゲノム遺伝子のクローニング	
序論	38
実験材料と実験方法	39
結果	42
考察	50
第五章 二十世紀、おさ二十世紀のS4-RNaseゲノム遺伝子の解析	
序論	56
実験材料と実験方法	58
結果	60
考察	65
第六章 総合考察	67
引用文献	72
謝辞	79

第一章 緒言

多くの植物は季節ごとに美しい花を咲かせ、私たちの目を楽しませてくれる。花は植物がその子孫を残すための大切な生殖器官であり、花粉が雌しべの柱頭につくと花粉管が発芽し、その花粉管は花柱を通して子房に達し受精が行われる(Fig.1)。ところが植物の中には自分自身の花粉を受粉した場合、花粉管の発芽または伸長が阻害されて受精できないものがある。このように、雌雄の生殖器官は正常なのに、受粉から受精に至る過程で自・他の花粉管を認識し、自己の花粉管の伸長を阻害して自家受精しない性質のことを自家不和合性といい、植物が近親交配を避けるために獲得発達させてきたものと考えられている。また、認識反応の起きる雌しべの柱頭や花柱部分は植物が被子植物に進化してから発達したものであるから、これは被子植物特有の性質であり、被子植物の半数以上が自家不和合性を有するといわれている(1)。これまでに行われた遺伝分析の結果、ほとんどの自家不和合性は1つのS遺伝子座の複対立遺伝子系(S_1 、 S_2 、 $\dots$ 、 S_n)で説明できると考えられている。

自家不和合性は、同型花型自家不和合性と異型花型自家不和合性に大別され、さらに同型花型自家不和合性は花粉のS遺伝子の発現時期から孢子体型と配偶体型に分けられる(Fig.2)。孢子体型自家不和合性においては花粉の認識行動が花粉を生み出した孢子体(親植物)の遺伝子型によって決定される。すなわち、雌しべ側のS遺伝子型が花粉自身のS遺伝子型とは異なっている場合、花粉は発芽しないか、発芽しても花粉管が柱頭に侵入できない(Fig.3-a)。この型の自家不和合性を示すアブラナ科植物の場合、雌しべ側のS遺伝子産物としてSLG(S-glycoprotein、S-locus glycoprotein)、SRK(S-receptor kinase)が同定されている(2-6)。

配偶体型自家不和合性においては、花粉の認識行動は花粉自身(配偶体)の持つS遺伝子型に支配される。すなわち、雌しべ側のS遺伝子型が花粉側のS遺伝子型と一致した場合、花粉管の伸長が花柱内で停止する(Fig.3-b)。この時、花粉管内のベシクル生産が異常になり、花粉管の先端が肥大し、最終的には花粉管が破裂する(1)。ナス科植物のタバコでは、雌しべ側のS遺伝子産物として同定されていたS糖蛋白質の一次構造がコウジカビ由来のリボヌクレアーゼT2の活性部位とホモロジーがあ

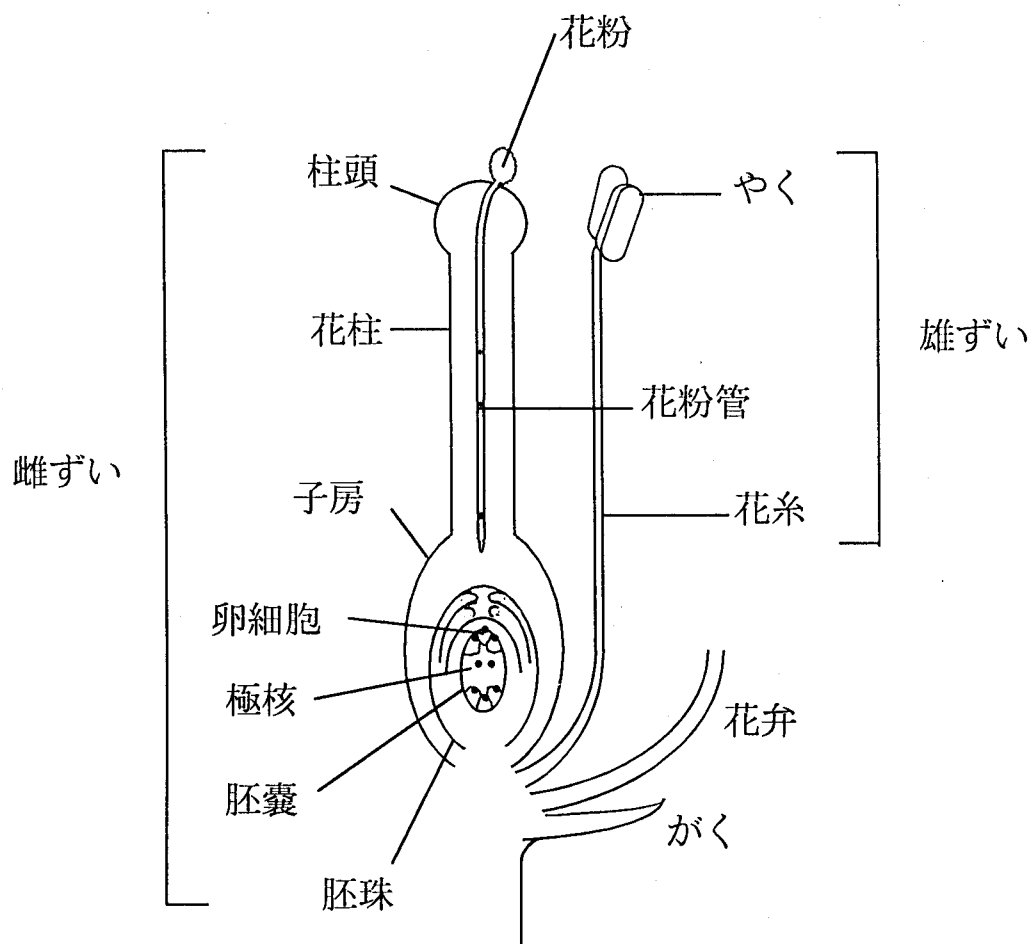


Fig.1 花の構造

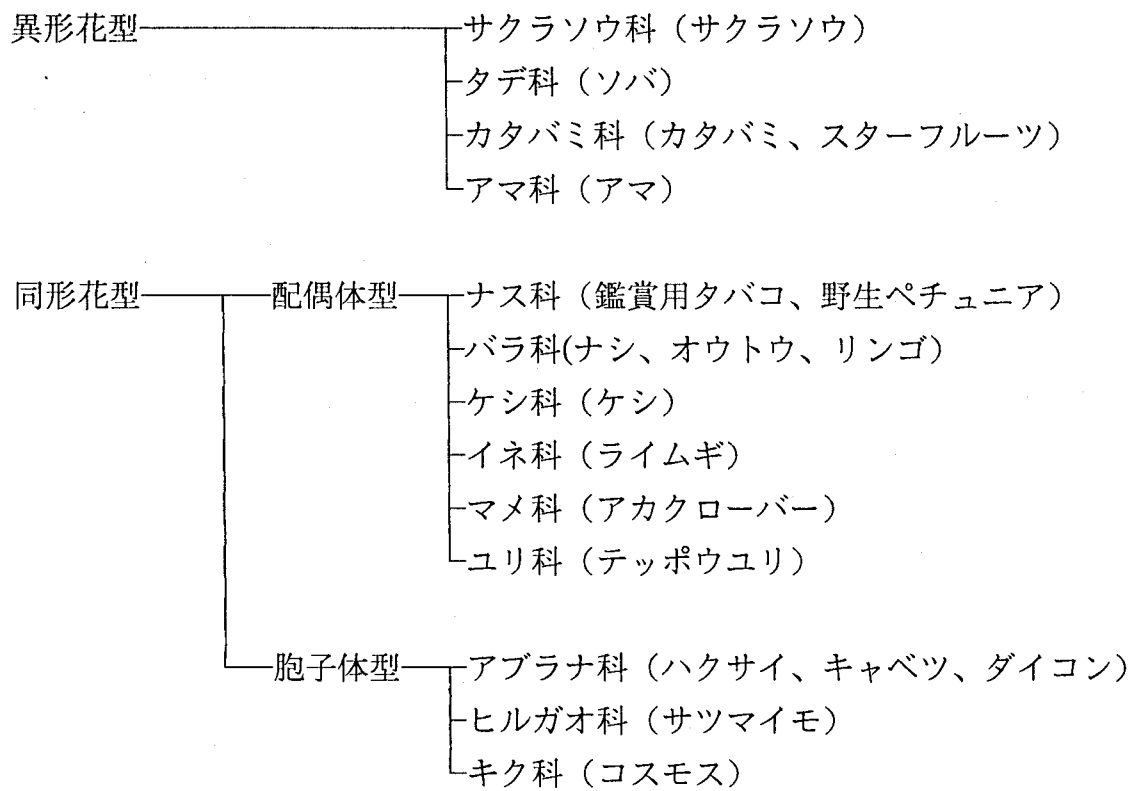
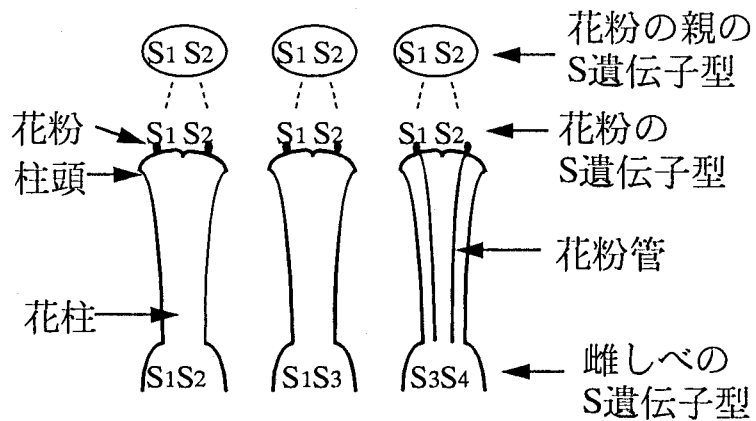


Fig.2 自家不和合性の分類と植物の例

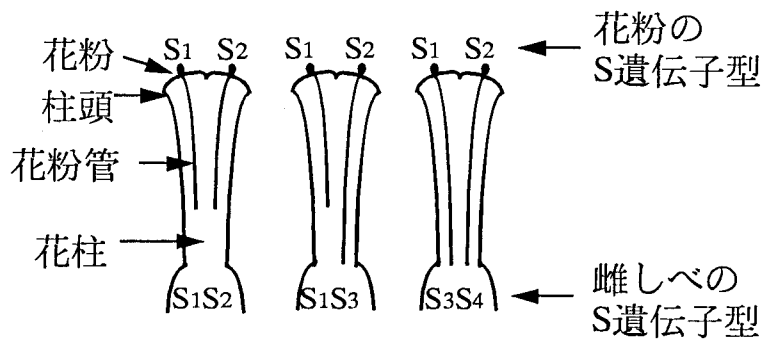
a) 胞子体型自家不和合性



アブラナ科 (キャベツ、ダイコンなど)

ヒルガオ科 (サツマイモなど)

b) 配偶体型自家不和合性



ナス科 (タバコ、ペチュニア、トマトなど)

バラ科 (ニホンナシ、リンゴなど)

Fig.3 自家不和合性の説明

り (7)、実際にRNase活性を持つことが示された (8)。同じくナス科のペチュニア、ジャガイモ、トマトでも花柱から同様のRNaseが見い出され、自家不和合性に関わる雌しべ側の因子として*S*-RNaseと呼ばれるようになった (2-4、9、10)。また、ゴマノハグサ科のキンギョソウでも雌しべから*S*-RNaseが検出されている (11)。

S-RNaseがどのような機構で花粉管の伸長阻害に関わっているのかについてはまだ不明であるが、ナス科植物では自家不和合性の発現には*S*-RNaseの存在とそのRNase活性が必須であることが、トランスジェニック植物や自家和合性突然変異体の解析より明らかとなっている (12-15)。また、タバコでは、自家受粉の場合のみ花粉管内のrRNAが分解されることが観察され、花柱に存在する*S*-RNaseが自己花粉の花粉管内に選択的に取り込まれ、rRNAを分解するために花粉管の伸長を阻害するという説が提唱されている (16、17)。一方、同じ配偶体型自家不和合性を示すケシ科の場合には、RNaseの関与は認められておらず (18)、別の因子として柱頭から22kDa、等電点が7.4~8.6の糖蛋白質が検出された (19)。

配偶体型自家不和合性を示す他科の植物ではどのような因子がどのような機構で自家不和合性を発現しているのかを調べることは、植物の進化と自家不和合性の出現との関係を理解する上で興味深いことである。そこで、私はバラ科に属するニホンナシを対象に研究を始めた。ニホンナシを選んだ理由は、ひとつには今までの交配実験の結果、栽培品種の*S*遺伝子型が*S*₁から*S*₇まで同定されていること (表 1)、もうひとつは、自家不和合性品種の二十世紀 (*S*₂*S*₄) の突然変異種として自家和合性のおさ二十世紀 (*S*₂*S*₄sm、smはstylar-part mutant) が存在していることである。おさ二十世紀は自家和合性であること以外は二十世紀と全く同じ性質であり (20)、他品種との交配実験から、雌しべ側の*S*₄遺伝子に突然変異がおこったため和合性になったと考えられている (21)。そのため、二十世紀とおさ二十世紀の蛋白質や遺伝子を比較することで自家不和合性に関わる因子を同定でき、それに伴ってニホンナシの自家不和合性の機構に関する情報が得られることが期待された。私たちは、すでにニホンナシの花柱にRNase活性を見い出し、ナス科植物同様に*S*-RNaseの関与を予想したが、おさ二十世紀の花柱にも二十世紀と同程度のRNase活性が見い出されたため (未発表)、RNase活性の詳細を明らかにすることにした。本論文は、ニホンナシの自家不和合性と*S*-RNaseとの関連性を解明するために、二十世紀とおさ二十世紀花柱に

S遺伝子型	品種
S_1S_2	<u>赤穂</u> <u>独逸</u> <u>早玉</u>
S_1S_4	<u>八雲</u> <u>翠星</u>
S_1S_5	<u>明月</u> <u>市原早生</u>
S_1S_6	<u>今村秋</u>
S_2S_3	<u>長十郎</u> <u>青長十郎</u> <u>青龍</u> <u>武蔵</u>
S_2S_4	<u>二十世紀</u> <u>菊水</u> <u>六月</u> <u>祇園</u> <u>早生二十世紀</u>
$S_2S_4^{sm}$	<u>おさ二十世紀</u>
S_2S_5	<u>須磨</u> <u>愛宕</u> <u>駒沢</u>
S_3S_5	<u>丹沢</u>
S_4S_5	<u>早生赤</u> <u>太白</u> <u>幸水</u> <u>新水</u> <u>旭</u>
S_6S_7	<u>晩三吉</u>

在来品種には下線を付した。

smは stylar part mutant

表 1 ナシの品種とS遺伝子型

存在するRNaseについて行なった遺伝子解析の研究を記述したものである。

第二章 ニホンナシ二十世紀花柱リボヌクレアーゼcDNAのクローニング

序論

二十世紀の花柱からはこれまでに3種類のRNaseが同定されており、1つは等電点が低く高活性型、他の2つは等電点が高く低活性型であった(22)。高活性型のRNaseについては他の品種からも同様のRNaseが同定され、それらのアミノ酸分析値、ペプチドマップがほとんど一致したことより、S遺伝子型にかかわらず、どの品種にも普遍的に存在するnon-S-RNaseであることが示された(22)。低活性型RNaseについては二次元電気泳動によって花柱蛋白質を分析し、他品種と比較したところ、S遺伝子型に対応して存在することが明らかとなった(23)。また、おさ二十世紀の花柱には高活性型のnon-S-RNaseと低活性型のS₂-RNaseに相当するRNaseしか検出されておらずS₄-RNaseの存在が疑問視されていた。それを明らかにするために、まず、二十世紀花柱の3種類のRNaseのcDNAのクローニングを行った。

実験材料と実験方法

実験材料

二十世紀の花は鳥取県園芸試験場で1994年4月に採集した。集めた花柱は即時に液体窒素で凍結し -70°C で保存した。mRNAの調製にはwhite bud期の花柱を用いた。Fast TrackTM mRNA isolation kit はInvitrogenから、AmpliTaq DNA polymerase、cDNA synthesis kit、BcaBESTTM dideoxy sequencing kitは宝酒造から、EcoRI-NotIアダプターはPharmaciaから、Packaging INNは日本ジーンから、Hybond Nと α - ^{32}P -dCTPはAmershamからそれぞれ購入した。

花柱より全RNAの調製

全RNAは二十世紀white bud花柱よりChomczynski とSacchiの方法 (24) を用いて抽出した。凍結保存した花柱500花分を液体窒素下乳鉢で粉碎し、液体窒素が蒸発した後10mlの抽出用緩衝液 (5M グアニジンイソチオシアネート、50mM トリス塩酸 (pH7.5)、10mM EDTA、30mg/ml ポリクラールAT、5% 2-メルカプトエタノール、0.5% サルコシル)を加え、不溶物を遠心により除去した。上清 (8ml) に1/10量 (80 μl) の2M 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.0)、水で飽和させた等量 (8ml) のフェノール、1/2量 (4ml) のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1 v/v) 混合液を加え、氷上で15分放置した後、遠心して上層 (8ml) をとり、等量 (8ml) のイソプロパノールを混合し、 -20°C で2時間放置した後、遠心してRNAを沈殿させた。RNAは70%エタノールで洗った後、減圧下で乾燥させた。

cDNAライブラリーの構築

全RNAよりFast TrackTM mRNA isolation kitを用いてmRNAを単離し、cDNA synthesis kitを用いてcDNAを合成した。得られたcDNAにEcoRI-NotIアダプターを付加、kination後、 λ gt10ベクターのEcoRIサイトに組み込み、Packaging INNを用いて λ ファージに組み込みcDNAライブラリーとした。

cDNAのPCR分析

蛋白質側の解析より明らかとなったnon-S-RNase、S4-RNaseのアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成しcDNAのPCR分析を行った。用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を以下に示す。

nonS-1 5'-CA(C/T)ACITG(C/T)TG(C/T)TA(C/T)CC-3'
nonS-2 5'-(C/T)TT(A/G)TT(A/G)CA(C/T)TGIATICC-3'
S-01 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'
S-02 5'-G(C/T)GGGGGCA(A/G)T(C/T)TATGAA-3'

nonS-1とnonS-2はnon-S-RNaseの、S-01とS-02はS4-RNaseのアミノ酸配列に基づいて合成した。PCR反応の条件は、次の通りである。

反応溶液50 μ l (30ng cDNA、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2mM dNTP混合液、2.5U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ、15pmol プライマー)

反応条件

プライマーnonS-1、nonS-2

94°C	2分	
94°C	40秒	}
40°C	2分	
70°C	2分	
70°C	10分	

35~40サイクル

プライマーS-01、S-02

94°C	2分	
94°C	40秒	}
48°C	2分	
70°C	2分	

35~40サイクル

70℃ 10分

PCR反応はHYBAID™ Thermal Reactor (Hook & Tucker Instruments) を用いて行った。PCR産物は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動でDNA鎖長を確認後、1.5%アガロースゲル電気泳動でDNAフラグメントを分離し、QianとWilkinsonの方法 (25) でゲルより回収した。得られたDNAフラグメントはT4ポリメラーゼで平滑末端にした後M13mp19ベクターのHincIIサイトに組み込み、DNAシーケンシングを行った。また、スクリーニングのプロープとするため、BcaBEST™を用いランダムラベリング法で³²Pラベルした。

cDNAライブラリーのスクリーニング

ホストセルはC600*hfl*を用い、角プレート (10x14cm) 1枚あたり2万プラークとなるようにファージをまき、cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。プロープにはプライマー-nonS-1とnonS-2、またはプライマー-S-01とS-02で増幅したPCRフラグメントを用い、それぞれ10万プラーク、8万プラークをスクリーニングした。プラークはマニュアルに従ってHybond Nフィルターに移した後ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、5xSSC、5xデンハルト溶液、100μg/ml 変性サケDNA) 中、42℃で1-4時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後³²PラベルしたPCRフラグメントを加え、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは0.1% SDSを含む0.1xSSCで三度、65℃で30分間洗い、intensify screenを用いて、-80℃で一日オートラジオグラフィを行った。

DNAシーケンシング

cDNAクローンはM13mp18またはM13mp19にサブクローニングし、BcaBEST™ DNA sequencing kitを用いて、島津シーケンサーDSQ-1でDNAシーケンシングを行った。

結果

cDNAライブラリーの構築

ニホンナシは4月上旬より開花し始めるが、その花はがくにおおわれたgreen bud期から、少し現れた花弁の先が淡いピンク色になったpink bud期、花弁がさらに大きく白くなった white bud期、開花直前の大きくふくらんだ balloon期を経て mature flowerへと成熟していく (Fig.4)。石水らの行なった花柱蛋白質の二次元電気泳動分析によると、S-RNaseはwhite bud期からballoon期にかけて急激に増加する (23)。そこで、white bud期の花柱からcDNAライブラリーを構築した。また、抽出溶液にポリクラーATを加えることで、ポリフェノール含量の高いニホンナシの花柱より効率よく全RNAを抽出することができた。

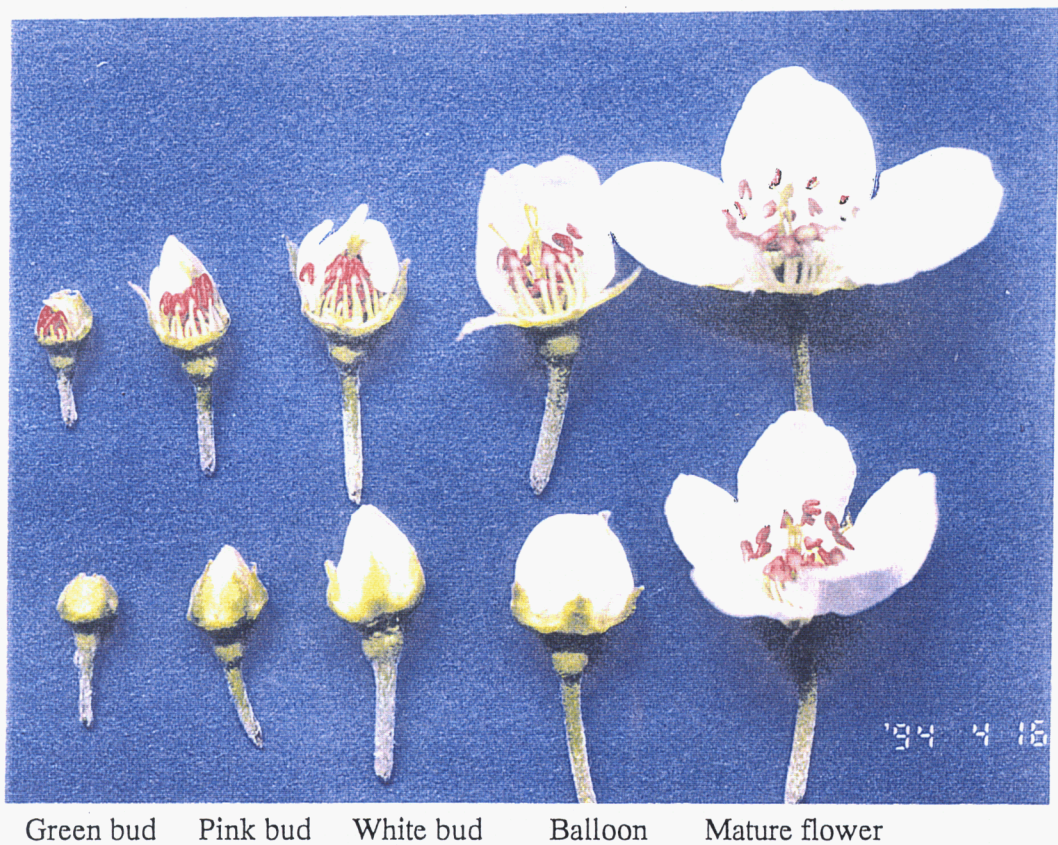
二十世紀white bud期の500花分の花柱から3.6mgの全RNAを得、InvitrogenのFast Track™ mRNA isolation kitを用いて18μgのmRNAを得た。以下、宝酒造のcDNA synthesis kitを用いてcDNAの合成を行い、常法に従って、λgt10ベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製した。

cDNAのPCR分析

二十世紀の花柱蛋白質の分析では、2種類以上のRNaseが検出されている。そこで、既に単離されていたnon-S-RNase、S4-RNaseの部分アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、得られたcDNAについてPCR分析を行った。

Non-S-RNaseについては、HTCCYP (21残基目から26残基目)、GIECNK (156残基目から161残基目) に相当するオリゴヌクレオチド、nonS-1とnonS-2をプライマーとしてPCRを行ったところ、約450bpのDNAフラグメントF1が増幅された (Fig.5)。F1は423bpからなり、その塩基配列より推定されるアミノ酸配列はnon-S-RNaseの部分アミノ酸配列と完全に一致した (Fig.6-a)。従って、F1はnon-S-RNaseのcDNAより増幅されたことがわかった。

S4-RNaseの部分アミノ酸配列FTQQYQ (6残基目から11残基目まで)、FINCPH



Green bud Pink bud White bud Balloon Mature flower

Fig.4 ニホンナシ（二十世紀）花の成熟過程

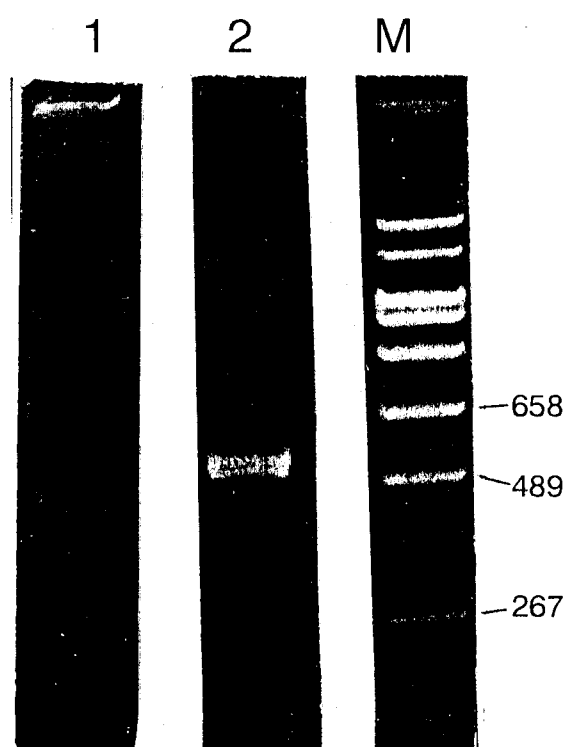


Fig. 5 二十世紀花柱cDNAのPCR分析

レーン1: プライマー nonS-1、nonS-2
 レーン1: プライマー S-01、S-02
 M : マーカー

a) F1 nons-1

CACACGTGCTGCTATCCCAAGTCAGGAAAGCCTACAGCAGATTTTGGCATTTCATGGTCTATGGCCTAATTATAAGAATGGTGGCTACCCC 90
H T C C Y P K S G K P T A D F G I H G L W P N Y K N G G Y P

TCCAACTGTGATCCCGACAGCGTCTTCGACAAATCTCAGATCTCAGAGCTGTTGACCAGTCTTAATAAGAACTGGCCATCACTGAGCTGC 180
S N C D P D S V F D K S Q I S E L L T S L N K N W P S L S C

CCAAGTAGCAACGGTTACAGGTTCTGGTCACATGAATGGGAAAAGCACGGGACTTGCTCCGAGTCCGAGCTCGATCAGAAAGAGTACTTC 270
P S S N G Y R F W S H E W E K H G T C S E S E L D Q K E Y F

GAAGCAGCCCTCAAACCTCAGAGAAAAAGTTAACCTTCTACAAATTCTAAAAATGCTGGAATCGTGCCAAATGATGAACCTTACAACCTA 360
E A A L K L R E K V N L L Q I L K N A G I V P N D E L Y N L

nons-2

GAGAGCATAGTGAAGCTATAAAAGTAGGTGTTGGGCACACCCCAGGCATCCAATGCAACAAG 423
E S I V E A I K V G V G H T P G I Q C N K

b) F2 S-01

TTTACGCAGCAATATCAGCAGGCTTTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTG 90
F T Q Q Y Q Q A F C N S N P T P C K D P P D K L F T V H G L

TGGCCTTCAACCAAAGTAGGACGTGACCCAGAATATTGCAAGACAAAGAGATATCGGAAGATACAAAGACTCGAACCCAGTTGGAATTT 180
W P S T K V G R D P E Y C K T K R Y R K I Q R L E P Q L E I

ATTTGGCCGAACGTATCCGATCGAAAAGCTAATCGAGGCTTCTGGCGTAAACAGTGGTACAAACATGGCTCCTGTGCGTCTCCCGCATTG 270
I W P N V S D R K A N R G F W R K Q W Y K H G S C A S P A L

CCGAACCAGAAGCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAATGTTCTTAGCGGAGAAACAAAACGTCTCTAGAATCCTCTCAATGGCGACGATT 360
P N Q K H Y F E T V I R M F L A E K Q N V S R I L S M A T I

GAACCGGAGGGGAAAAACAGGACACTGTTGGAATTCAAAATGCCATACGCGCTGGTACCAACAATATGATACCAAACTCAAGTGCCAA 450
E P E G K N R T L L E I Q N A I R A G T N N M I P K L K C Q

S-02

AAGGTTAATGGGATGACTGAATTGTTGAGGTCACCTTTTGCCACGATAGCAACTTAACGCAATTCATAAAATTGCCCCCGC 531
K V N G M T E L V E V T L C H D S N L T Q F I N C P R

c) F3 S-01

TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAACGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTG 90
F T Q Q Y Q P A V C N S N P T P C N D P T D K L F T V H G L

TGGCCTTCAACAGGAATGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGACTACAACCATGAATTCTCAGAAGATAGGAAATATGACAGCCCAGTTG 180
W P S N R N G P D P E K C K T T T M N S Q K I G N M T A Q L

GAAATTATTTGGCCGAACGTTCTCAATCGAAGCGATCATGTAGGCTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCAAACATGGCACCTGTGGGTATCCC 270
E I I W P N V L N R S D H V G F W E R E W L K H G T C G Y P

ACAATAAAGGACGACATGCATTATTTAAAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTGCAATCCTCTCAAAGGCG 360
T I K D D M H Y L K T V I K M Y I T Q K Q N V S A I L S K A

ACGATTCAACCGAACGGGAATAACAGGTCACCTGGTGGATATTGAAAATGCCATACGCGAGTGGTAACAACAATACGAAACCAAATTC AAG 450
T I Q P N G N N R S L V D I E N A I R S G N N N T K P K F K

S-02

TGCCAAAAGAATACTAGGACGACGACTGAATTGTTGAGGTCACCTTTGCAGTAATAGAGACTTGACTAATTCATAAAATTGCCCCCAC 540
C Q K N T R T T T E L V E V T L C S N R D L T K F I N C P H

Fig.6 PCRフラグメントの塩基配列
はPCRのプライマーの位置を示す。

(180残基目から185残基目まで)に相当するオリゴヌクレオチド、S-01とS-02をプライマーとしてPCRを行ったところ、約520bpの2種類のDNAフラグメントが増幅された (Fig.5)。M13ベクターに組み込みDNAシーケンシングを行った結果、F2、F3の2種類のDNAフラグメントが得られた。F3は540bpよりなり、推定されるアミノ酸配列はS4-RNaseの部分アミノ酸配列と完全に一致した (Fig.6-c)。F2は531bpからなり、これは後に得られたS2-RNaseの部分アミノ酸配列と一致した (Fig.6-b)。従って、F2はS2-RNaseの、F3はS4-RNaseのcDNAよりそれぞれ増幅されたことがわかった。

cDNAライブラリーのスクリーニングと得られたクローンの塩基配列

a) Non-S-RNase遺伝子 (*ns-nons*)

得られたPCRフラグメントF1をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、10万個のプラークより2個のポジティブクローンが得られた。そのうち長いほうのクローンの塩基配列および推定アミノ酸配列をFig.7に示す。このクローンは853bpよりなり、19残基目のGln以下はnon-S-RNaseのアミノ酸配列と完全に一致したことより、non-S-RNaseのcDNA、*ns-nons*であることがわかった。*ns-nons*の3'-側の非翻訳領域にはポリA付加シグナルと推定されるAATAAAの配列が終止コドン (TTA) の150bp下流に存在する。また、分泌性のnon-S-RNaseはシグナル配列を持つと推定されるが、おそらくcDNAの合成が不完全であったため、今回クローン化した*ns-nons*については翻訳開始Metを含む完全なcDNAは得られなかった。

b) S2-RNase遺伝子 (*ns-s2*)

PCRフラグメントF2をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、8万個のプラークより5個のポジティブクローンを得た。最も長いクローンの塩基配列および推定アミノ酸配列をFig.8に示す。このクローンは875bpよりなり、678bpのオープンリーディングフレームを含む。26残基目のAla以下201残基のアミノ酸配列はS2-RNaseのアミノ酸配列と完全に一致し、これがS2-RNaseのcDNA、*ns-s2*であることが確認された。*ns-s2*は25残基のシグナルペプチドを持ち、3'-側の非翻訳領域にはポリA付加シグナルと推定される配列、AATAAA、AATTAAAAがそれぞれ終止コドン (TTA) の64bp、81bp下流に存在する。PCRプライマーS-01、S-02に相当する部分の塩基配列はS4-RNaseの対応する配列とそれぞれ100%、94%の相同性があるため、上記

のPCR条件ではF2がF3と共に増幅されたと考えられる。

c) S4-RNase遺伝子 (*ns-s4*)

PCRフラグメントF3をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、8万個のプラークより6個のポジティブクローンを得た。最も長いクローンの塩基配列および推定アミノ酸配列をFig.9に示す。このクローンは997bpよりなり、684bpのオープンリーディングフレームを含む。28残基目のPhe以下201残基のアミノ酸配列はS4-RNaseのアミノ酸配列と完全に一致し、これがS4-RNaseのcDNA、*ns-s4*であることを確認した。*ns-s4*は27残基のシグナルペプチドを持ち、3'-側の非翻訳領域にはポリA付加シグナルと推定される配列、ATAAA、AATTAAAAがそれぞれ終止コドン (TTA) の169bp、175bp下流に存在する。さらに、3'-側の非翻訳領域には、終止コドン (TTA) の19bp下流より始まり、"GT"が"GCTT"をはさんでそれぞれ22個、9個反復するGTの繰返し配列が存在しており、*ns-s4*に特徴的な構造モチーフ (マイクロサテライト) となっている。

CTTTGATCTTGATCAAGCTTTTGATCATTCAGTACCTCTCGGTTCTTTGGTTCTTGTGTTCTCTCAGGACTTTGATTTCTTACTTTTGTTCAAACAGTGGCCAGGAGCATACTGCCACACAAAGCATA
L I L I K L L I I Q Y L S V L C V S Q D F F Y F V Q Q W P G A Y C D T K H T
nonS-1
CTTTGTTGCTATCCCAAGTCAGGAAAGCCTACAGCAGATTTTGGCATTTCATGGTCTATGGCCTAATTATAAGGATGGTGCTACCCCTCTAACTGTGATCCCGACAGCGCTTTCGACAAAT
C C Y P K S G K P T A D F G I H G L W P N Y K D G G Y P S N C D P D S V F D K S
CTCAGATCTCAGAGCTGTTGACCAAGTCTTAATAAGAACTGGCCATCACTGAGCTGCCCAAGTAGCAACGGTTCTGGTCAACATGAATGGGAAAAGCACGGGACTTGCTCCGAGT
Q I S E L L T S L N K N W P S L S C P S S N G Y R F W S H E W E K H G T C S E S
CCGAGCTCGATCAGAAAAGAGTACTTCGAAGCAGCCCTCAAACCTCAGAGAAAAAGTTAACCTTCTACAAATTTCTAAAAAATGCTGGAATCGTGCCAAATGATGAACTTTTACAACCTAGAGA
E L D Q K E Y F E A A L K L R E K V N L L Q I L K N A G I V P N D E L Y N L E S
nonS-2
GCATAGTGAAGCTATAAAGTAGGTGTTGGGCACACCCAGGATTGAGTGCAACAAGGATTCGGCCGGAAAACAGCCAACTTTTACCAAAATTTATTTGTGTGTCGACACTTCTGGCCAAAG
I V E A I K V G V G H T P G I E C N K D S A G N S Q L Y Q I Y L C V D T S G Q N
ACATCATCGAGTGTCCTCTCCTTCCAAAGGACGATGTGCTTCCAAAATTCAATTCCCTAAAATTTTAAATTAACCTCATTTGTGTAATTTCTTTTACAATAATCTTTTACTTTTGTAACTTGTT
I I E C P L L P K G R C A S K I Q F P K F *
ACTCTTGATGTATCTTTGGCTACCGATGTTGCTTTCAACTAGCTAGCCACTTCATGTGTCATTAGTCATGACTAATTGATGAACCTTTCATGTTCTAATAATTTAACTTAACTTTTG
CTTAAAAA

Fig. 7 ns-nonsの塩基配列

斜体は推定シグナル配列、はPCRのプライマラーの位置、*は停止コドン、二重下線は推定polyA付加シグナルを示す。

S-03

AGTAATTAATTTGCCTCGCTCTTGAACAAATATATTCAATGAGGATTACGGGGATGATATATTTTACGATGGTATTTTCAATTAATGTATTAATTTGTCTTCCGCGGCGGAGAA
M R I T G M I Y I F T M V F S L N V L I L S S A A R

TACGATTATTTTCAATTTACGAGCAATATATCAGCAGGCTTTCTGCAACTCTAATCCTACTCTCTTGTAAAGGATCCTCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTACGGCTTCAACCAAA
Y D Y F Q Q F T Q Q Y Q Q A F C N S N P T P C K D P P D K L F T V H G L W P S T K

GTAGGACGTGACCCAGAAATATTGCAAGACAAAGAGATATCGGAAGATACAAAGACTCGAACCCCGAGTTGGAAATTTATTTGGCCGAAAGCTATCCGATCGAAAAAGCTAATCGAGGCTTCTGG
V G R D P E Y C K T K R Y R K I Q R L E P Q L E I I W P N V S D R K A N R G F W

CGTAAACAGTGGTACAAACATGGCTCCTGTGCTCTCCGCAATGCGGAACAGAGCATTAATTTGAAACAGTAATCAGAAATGTTCTTAGCGGAGAAACAAACGTCCTCTAGAAATCCTC
R K Q W Y K H G S C A S P A L P N Q K H Y F E T V I R M F L A E K Q N V S R I L

TCAATGGCGACGATTGAACCGGAGGGGAAAAACAGGACACTGTTGGAAATTCAAAATGCCATACGCGGTGTACCAACAATATGATACCAAACTCAAGTGCCAAAAAGTTAATGGGATG
S M A T I E P E G K N R T L L E I Q N A I R A G T N N M I P K L K C Q K V N G M

ACTGAATTTGGTTGAGGTCACTCTTTGCCACGATAGCAACTTAACGAGTTTCATAAAATTTGCCCGCCCATTTGCCACAAGCATCACCATATTTCTGCCCCATTTGATGATATTCAGTATTAA
T E L V E V T L C H D S N L T Q F I N C P R P L P Q A S P Y F C P I D D I Q Y *

S-05

GAGCTAGTATATATAAGAAAGTTGGCCCTAATACGGATGGCGATTTCATATATAGGACGAGGAATGCAGTTATGTGATTCTTAATGAATAAAATTTGGCTTAATCAATTAATACTC
TTGTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig.8 ns-s2の塩基配列

斜体は推定シグナル配列、NはN-グリコシド型糖鎖の推定結合位置、*は停止コドン、
はPCRのプライマーの位置、二重下線は推定polyA付加シグナルを示す。

[illegible]

Fig.9 ns-s4の塩基配列

斜体は推定シグナル配列、NはN-グリコシド型糖鎖の推定結合位置、*は停止コドン、
はPCRのプライマーの位置、二重下線は推定polyA付加シグナルを示す。

考察

ニホンナシ二十世紀の花柱からは、3種類のRNaseがクロマトグラフィー (22) あるいは2次元電気泳動 (23) により蛋白質として同定されている。そのうちの1種類はS遺伝子座とは連鎖していないnon-S-RNaseであり (22)、2種類はS2-RNase、S4-RNaseである (23)。今回、二十世紀のwhite bud期花柱よりcDNAライブラリーを作製し、これら3種類のRNaseのcDNA、*ns-nons*、*ns-s2*、*ns-s4*をクローニングした。いずれのcDNAも5'-側にシグナル配列をコードしていると思われる配列が、3'-側にはポリA付加シグナルと思われるATAAA、AATAAA、AATTAAAAの配列が存在し、3種類の花柱RNaseをコードする遺伝子であると結論した。

ns-s2、*ns-s4*のオープンリーディングフレームにはそれぞれ、1、6、12番目、1、6、9、12番目にMetのコドンがあるが、いずれのMetから蛋白質に翻訳されるかは不明である。*ns-nons*については全翻訳領域を含む完全なcDNAは得られなかったが、non-S-RNaseはおさ二十世紀花柱にも見出されており、white bud期花柱より完全長のcDNA、*os-nons*がクローニングされている (26、27)。そこで、*ns-nons*、*os-nons*の塩基配列を比較したところ、*ns-nons*の全塩基配列は*os-nons*の配列と完全に一致し (Fig.10)、両品種のnon-S-RNaseのペプチドマップも一致していることから (22) 両cDNAは同一であると結論した。この結論をもとに*os-nons*の塩基配列を調べると、non-S-RNaseは24残基のシグナル配列を持つことがわかった。また*os-nons*では6、9、12番目のMetのコドンは存在せず1番目にのみ存在するため、このMetから蛋白質に翻訳されるものと推定される。この翻訳開始Metコドンの前後にはGACAATGAG配列があり、この配列は植物の翻訳開始領域のコンセンサス配列と考えられているAACAAATGGCと相同的である (28)。特に、CAATG配列は*ns-s2*のオープンリーディングフレームの1番目、*ns-s4*のオープンリーディングフレームの1、12番目のMetコドンの位置にも見られ、シグナル配列の長さを考慮すると、*ns-s2*、*ns-s4*のコードする蛋白質はどちらも第1番目のMetから翻訳されると考えられる。おもしろいことに、今までに報告されているバラ科植物のS-RNaseのcDNAを比較すると、第1番目のMetコドンを含む配列ATTATTCAATGは共通して存在しており (Fig.11)、S-RNaseの翻訳開始のシグナルとして作用しているのかもしれない。Gene Bankより、今までにクロー

Japanese pear

S2 CCACGGCCACTACTCTCAAAATGG---AG---GA---AATT-AGTAATTAAATTTGCCCTCGCTCTTGAACAAAT-----ATTATTCRAATGAGGATTCACGGGATGATATATATATTTTACGAT
S4 CCACCACCTATACTACTTGA AAAAGTTTAAATCGATCTAATT-AGTAATTAAATCTGCCCTCGCTCTTGAACAAATTAATATTAATTCRAATGGGAATTACGGGGATGACATATATGTTTACAAT

Apple

S2 TTTTCAAAAAGTCCAAATCGATCATATTAAGTAATTAAGTCTGCCCTTGCCTCTTGAACAAAT-----ATTATTCRAATGGGACCTACGGGATGATATATATAGTTACGAT
S3 TAATGGATCAAAATTA-GTAATTAATCTGCCCTCGCTCTTGAACAAAC-----ATTATTCRAATGGGATTCACGGGATGATATATATATGTTTACAAT
S5
S7
S9
Sc
Sf TTGRACAAAT-----ATTATTCRAATGGGATTCACGGGATGATATATATGTTTACTAT
TCTGA-TTTTAATCTGCCCTTGCACCTTGAACAAAT-----ATTATTCRAATGGGATTCACGGGATGATATATATGTTTATGAT
TGGATCAAAATTC-GTAATTAATCTGCCCTCGCACTTGAATCAAT-----ATTATTCRAATGGTG---ACGGGATGATATATATGTTTATGAT

Japanese pear

S2 GGTAATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCCGGCGAGATACGATTATTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCAGGGCTTCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAAAGGATCC
S4 GGTAATTTGCTATTAATGTAATTAATTTCTCGGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTAATGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAAAGGATCC

Apple

S2 GTATATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAAAGGATCC
S3 GGTAATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCCGGTGAAATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAAAGGATCC
S5
S7 TTAAGGATCC
S9 GGTAATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCTACGGTAGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAGAGATCC
Sc GGTAATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCTACGGTAGGATACGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAGAGATCC
Sf GGTAATTTTCATTAATGTAATTAATTTGCTCTCGTCTACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACTCTAATCCCTACTCCTTGTAAAGGATCC

Japanese pear

S2 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAACCAAGTAGGACGTGACCCAGAAATATTGCAAGACAAGAGATATCGG-----AAGATACAAGA---CTCGAACCCCA
S4 TACTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAACCAAGTAGGACGTGACCCAGAAATATGCAAGACAAGAGATATCTCAGAAAGATAGGAA-AH---ATGACAGCCCA

Apple

S2 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAACCATGAATCGAATGAATTTTAATTTGCAAGTTGAGCTTATGCGAAGATACAAA-AT--ATCCGAACCCCA
S3 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCATGGTTTGTGGCTTCAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAACTACAATCTTGAACCTCAAAACGATTAACAA-AT--CTTACAGCCCA
S5 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGATTGTGGCTTCAACTTAAATGGAACCTGACCCAGAAAACHTGCAAGGTCAAAACCCACGGCTCTCAAAACGATAGATACATCACTCAAAACCCCA
S7 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAAGCTCGAATGGACATGACCCAGTAAATTCACACCTGGATGCTTCAGAAAGTTAGGAA-AT--CTGACAACTCA
S9 TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAACAGCTCAGGAAATGACCCCAATATATCTGCAAGAAATACAACTGAATTTCTACTAAGATAGCAA-AT--CTGACAGCCGG
Sc TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAACAGCTCAGGAAATGACCCCAATATATCTGCAAGAAATACAACTGAATTTCTACTAAGATAGCAA-AT--CTGACAGCCGG
Sf TCCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTCACGGTTTGTGGCTTCAAACTCGAATGGAAATGACCCAGAAATATTGTGAAG-CACCGCCAT--ATCATAC---GATA-AAA-ATG-CTCGAACCCCA

Japanese pear

S2 GTTGGAAATTAATTTGGCCGGAACGHTATCCGATCGAAAAAGCTAATCGAGGCTTCTGGCGTAACACAGTGGTACAAACATGGCTCCTGTGCGTCTCCCGCATTTGCCGAACGAGCATTACTTT
S4 GTTGGAAATTAATTTGGCCGGAACGHTTCTCAATCGAAGCGATCATGTAGGCTTCTGGGAAAGAGAGTGGCTCARACATGGCACCTGTGGGTATCCCAAAATAAGGACGACATGCATTATTT

Apple

FF - C

S2	GTTCGGAATGATTTGGCCAAACCGTATTCAATCGAAAAATCATTTTAGCTTCTCGGAATAGAGAGTGAACAACAACGGCGCCTGTGGGTATCCCAATATACGGAACGACATTGCATTACCTT
S3	GCTGGAAAATTATTGGCCAAACCGTACTCAATCGAAGGCTCATCGACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCACCTGTGGGTACCCCAATAGCGGACGACATGCAATTACCTT
S5	GTTCGGAATATTATTGGCCGAACCGTATTCAATCGAGCGCATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAAACATGGCAACCTGTGGGTCTGCCACAATAATAGACAAGAACCATTTACCTT
S7	GTTCGGAATAATTATTGGCCGAACCGTATACAAATCGAACCGCATCATATAAGCTTCTGGGATAAACAGTGGAAACAACATGGCACCTGTGGACATCCCAATAATGACGACATTCTCATTTACCTT
S9	GTTCGGAATAATTATTGGCCCAACCGTACTCGATCGAACCGATCATATAACCTTCTCGGAATAAACAGTGGAAACAACAATGGCAGCTGTGGGCATCCCGCAATATACAGAACGACATGCAATTATT
Sc	GTTCGGAATAATTATTGGCCCAACCGTACTCGAATCGAATCGATCATATAACCTTCTCGGAATAAACAGTGGAAACAACAATGGCAGCTGTGGGCATCCCGCAATATACAGAACGACATGCAATTATT
Sf	GTTCGGTAATTATTATTGGCCGAACCGTACTCAATCGAAACGATCATGAAAGCTTCTGGCGTAAACAGTGGGATAAACATGGCTCTTTGGCGCTCTTGGCCCAATACAGAACCCAGAACGCAATTACCTT

Japanese pear

[illegible]

Apple

ppc

S2	TCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAACGTCCTCTGATATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCCGGATGGAAATATCAGGACACACAGAAAGAAATTTGTAGATGCCATAAG
S3	TAGCACAGTAATCGAAATGTACATTAACCAAGAACAAAATGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCCGAAATTTAAACCCGGAGAAAGAAATTCAGGACACGGGACGACATTTGTGAATGCCATAAG
S5	TGAAACAGTAATCAGAATGTACATAACCCGAGAACGCAAAAACGTCCTCTATATCCTTATCCTATCCARAGCCAATATCAATCCCGGATGGTAAAGGACGACACGGAAAGGATATTCAAATTTGCCATAAG
S7	TCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCCTCTAAATTCCTCTCAAGGGCGRAGATTGAACCCGGAGGGAAACCCCGAAACAGGTAGATATTTGTAATGCCATAAG
S9	GCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCCTCTGAAATTCCTCTCAAAGGCCGAAAGATTGAACCCGGTGGGAAATTCAGGACACACAGAAAGAAATTTGAAAGGCCATAAG
Sc	GCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCCTCTGAAATTCCTCTCAAAGGCCGAAAGATTGAACCCGGTGGGAAATTCAGGACACACAGAAAGAAATTTGAAAGGCCATAAG
Sf	TGATACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCCTCTGAAATTCCTCTCAAAGGCCGAAATATAAAACCTGGTAGGAPAAAACAGGCCACTGGTGGACATTTGGAATAATGCCATAAG

Japanese pear

Japanese Fear

S2 CGCTGGTACCAACAATATGATACCAAAACCTCAAGTGCCTAAAGCTTAATGGGATG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCCACGATAGCAACTTTAACCGCAGTTTCATAAATTG

S4 CAGTGGTACCAACAATACGAAGCCGAAATTCGAGTGGCCAAAAGAAATCTACTAGCCGACG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCCAGTAAATAGAGACTTGATCAATAAATTG

Apple

ppe
 S2 AAAAGGTATCCATGGTAAGGAACGAAACCTCAAGTGC AAAAGAAATACTCAGATG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTTGCAGCGATGGCAACTTAAAGCAGTTCATAGATTG
 S3 CCAAGTATCGACTATAAGAAACCCAAAACCTCAAGTGC AAGCAACAATAATCAGATA-----ACTGAATTGGTTGAGGTGGTCTTTTGCAGCGATAACAACTTTAAACCGCAGTTCATAGATTG
 S5 CAATAGTACCAACGATAAGGAACCCAAAACCTCAAGTGC CCAACGAAATGGGATA-----ACTGAATTGGTTGAGGTCTCTCTTTTGCAGCAATTACTTCGGAAAAAATTTTCATATAAATTG
 S7 CAAAGGTACAAACCGATAAGGAACCCAAAACCTCAAGTGC CCAAGAAATAACCAAGGTG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTTGCAGTAATTCGCAACCTTAACCGGGTTTCATATAAATTG
 S9 CAAAGGTACCAATAATAAGGAACCCAAAACCTCAAGTGC CCAARAAGAAATAGTCAGAG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTATTTTGTAGCGATCGCAACTTAAACCGAGTTCATAGATTG
 Sc CAAAGGTACCAATAATAAGGAACCCAAAACCTCAAGTGC CCAARAAGAAATAGTCAGAG-----ACTGAATTGGTTGAGGTCACTATTTTGTAGCGATCGCAACTTAAACCGAGTTCATAGATTG
 S8 CAATGTTATCAACAAATATGACACCCAAAATTTCAAGTGC CCAAGAATACTAGCAACATCATTTGACTGAATTGGTTGAGGTGGTCTTTTGCAGTGAAGCAACTTAAACCGCAGTTCATATAAATTG

Japanese pear

[illegible]

ニングされたニホンナシのcDNAについて検索したところ、CAATG配列がニホンナシのlight harvesting a/b binding proteinのcDNAのオープンリーディングフレームの5番目のMetコドン、ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenaseのcDNAの1、5番目のMetコドンにも見られた (Fig.12)。この配列が実際にニホンナシの翻訳開始に関与しているとすれば興味深い。これら2つのcDNAには開始Metの5'-側にGAGAGAGAという配列があるが、*os-nons*にもGAGAGAの配列があり、S遺伝子に関与していない蛋白質の翻訳に関係しているのかもしれない。

*ns-s4*の3'-側の非翻訳領域に見いだされたGTの繰返し配列は*ns-s2*には存在しないが、同じバラ科に属するリンゴの*S5-RNase*、*S9-RNase* (29)、*Sc-RNase*、*Sf-RNase* (30)のcDNAには短いGTの繰返し配列が存在する。またニホンナシ*S2-RNase*、リンゴの*S5-RNase*、*S7-RNase*、*S9-RNase*、*Sc-RNase*、*Sf-RNase*のcDNAには、同じ領域にATの繰返し配列も存在している。これらの繰返し配列の5'-側は翻訳領域であり、*S-RNase*遺伝子間では相同性が高いが、3'-側の非翻訳領域にも90bpにわたって80%~94%と相同性の高い領域が続いており (Fig.11)、マイクロサテライトの役割を考える上で興味深い。

哺乳動物DNAでは、GT(CA)の繰返し配列は2塩基の繰返し配列の中で最も頻繁に現れる (31)。これらの繰返し配列の役割はまだよくわかっていないが、プリン/ピリミジンの繰返し配列はZ-DNAを形成する傾向があり、何らかの生理的役割が考えられる。実際にGT(CA)の繰返し配列が塩濃度などの外的因子の影響によって左まきのZ-DNAを形成することが報告されており (32、33)、遺伝子の組替え (34、35)、発現調節 (36、37)、クロモソームのパッキング (38) などへの関与が報告されている。植物では動物とは異なり、GT(CA)の繰返し配列は最も出現頻度が低い (39、40)。ニホンナシ、リンゴの場合、S遺伝子型により異なる繰返し配列が相同性の高い領域には含まれて存在しており、cDNAが多型を示す一因となっているのかもしれない。

塩基配列より推定されるアミノ酸配列をみると、*ns-nons*、*ns-s2*、*ns-s4*はいずれもN末端にシグナル配列を持つ分泌蛋白質であり、T2型のリボヌクレアーゼの活性に必要なHis残基周辺のアミノ酸配列 (HGLWP、KHGXC)、立体構造の保持に必要と思われる8つのCys残基の位置がよく保存されている (Fig.13)。S4-RNaseの構造解析の結果によると、これら8つのCys残基は4つのS-S結合 (Cys15-Cys22、Cys48-Cys92、

light harvesting a/b protein

CGTGAAC TAAGT GCGCT CCTTCTG CGTGAGAGCGGCGAAAGCAAAGCAAGGAGAGAGATAGGATGGCTACAACAATGGCG
M A T T M A..

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase subunit

AAGTAAAGCACTCAAGCAAAGAAGAGAAAGCAGAGAGAGAGAGCAATGGCTTGGTGAATGATTTCTCCGGTACCGTGCG
M A S S M I S S G T V A.

Fig.12 ニホンナシ light harvesting a/b protein、
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase subunitの
cDNAの翻訳開始Met付近の塩基配列

下線はCAATG配列を示す。

Cys156-Cys195、Cys172-Cys183)を形成している(41)。タバコのS6-RNaseでも対応する各Cys残基(Cys16-Cys21、Cys45-Cys94、Cys153-Cys182、Cys165-Cys176)がS-S結合を形成している(41)。また、non-S-RNaseにはN-グリコシド型糖鎖の結合サイトは存在しないが、S2-RNaseには4箇所、S4-RNaseには5箇所の糖鎖結合可能なサイトが存在する(Fig.8、Fig.9)。S4-RNaseでは5箇所の糖鎖結合サイトにはすべて糖鎖が結合しているが(41)、S-RNaseに結合している糖鎖については、ナス科(ペチュニア、タバコ)、ケシ科(ヒナゲシ)では、糖鎖は自家不和合性の花粉との認識反応には必要ないこと(42、43)、異なった遺伝子型のS-RNaseでも糖鎖構造にはっきりした差が見られないこと(44)から、自家不和合性反応には関係ないものと思われる。

ナス科とバラ科のS-RNaseの構造を比較すると(Fig.13)、両者とも保存領域と変異の激しい可変領域がある。すなわち、ナス科S-RNaseにはC1~C5の保存領域とHV1~HV5の可変領域があり、バラ科S-RNaseにはC1~C7の保存領域とHV1、HV2の可変領域がある。ナス科のC3とC5、バラ科のC2とC3はRNase活性に必要なHis残基を含むためアミノ酸配列も両者でよく保存されているが、双方のC1、ナス科のC6とバラ科のC4、ナス科のC5とバラ科のC7は一次構造上同じ位置にある保存領域にもかかわらず、互いのアミノ酸配列は異なっている。また、ナス科のHV1、HV3にあたる可変領域はバラ科ではC2、C4の保存領域となっている。バラ科のHV1、ナス科のHV2は、最も変異の激しい部位であり、各S-RNaseの構造の違いが最もよく反映されている部位である。自家不和合性における花粉管とのS遺伝子型に特異的な認識反応はこの可変領域を介して行われるものと思われる。この可変領域を*Rhizopus niveus*由来のT2型のリボヌクレアーゼ、RNase Rhの立体構造(45)にあてはめると、RNase RhのCys-63から外部に突き出たループと、その後続く2つの α ヘリックス部分に相当する(Fig.14、赤で示した部分)。したがって、蛋白質分子表面にあるHV1部分が花粉管側の因子との認識反応に関わっている可能性が考えられる。S-RNaseのX線結晶構造解析を待ちたい。

non-S-RNaseのように、花器官で発現しているがS遺伝子座に連鎖していないT2型のRNaseは、タバコ(46、47)、ペチュニア(48)でも見出されている。また、T2型のRNase自体はトマトの培養細胞(49-51)、自家和合性のシロイヌナズナ(52、53)、

S遺伝子座に連鎖していないRNase

	*	#	####	*	#	*	#	*	#	*	#
nons-RNS	QDFDFYFVQOWPGAYCDHHTCCYPSKPKGPTADFGHGLWPNYKDGYPSCNCDPDSVFDKSISEILTSLNKNWESLSCP	SSNGYR	--	FWSHEWEKHGTCSESEL-D							
RNS-NE	AQDFDFYFVQOWPGSYCDTKQSCCYPKTKGPASDFGIHGLWPNNDGSPYDQSDLSRMOONWETLACP	SGTCSA	--	FWSHEWEKHGTCSESIF-D							
RNS-LE	AKDFDFYFVQOWPGSYCDTKQSCCYPTTKGPAADFGHGLWPNNDGSPYDQSDLSRMOONWETLACP	SGSGST	--	FWSHEWEKHGTCAESVLTN							
RNS-LX	SQDFDFYFVQOWPGASYCDTRRSSCCYPTTKGPEDEDFSIHGLWPNYKDG-WPQNCDBRESSLDESEFSDLSITMEKNWESLACP	SSDGLK	--	FWSHEWEKHGTCSA--L-N							

バラ科S-RNase

	*	#	*	#	*	#	*	#	*	#
PPS2	ARYDYFQFTQQYQQAFCNSNP	TPCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	TKVGRDEYCKTKR	--	YRKI-QRIEPPQLEIIWP	NVSDRK-ANRG	--	FWRKQWYKHGSCASPALP
PPS4	FDYFQFTQQYQPAVCNSNP	PCNDPDK	---	LFTVHGLWPS	NRNGPDEKCKTTMNSQKIG	---	NMTAQLEIIWP	NVLNRS-DHVG	--	FWERWLKHGTCGYPTIK
MDS2	YDYFQFTQQYQPAACNSNP	TPCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNMRSELENCSSSNVYAKI	---	QNTQTQLEMIWP	NVFNKR-NHLG	--	FWNREWNKHGACGYPTIR
MDS3	FDYFQFTQQYQPAVCSSNP	TPCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNVNGSDEKCKTTILNPQT	---	TNLTAQLEIIWP	NVLNKR-AHAR	--	FWRKQWYKHGTCGYPTIA
MDS5		DPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNFNGPDECKVKPTASQT	---	DTSLKPQLEIIWP	NVFNRA-DHES	--	FWOKQWYKHGTCGSPITII
MDS7	YDYFQFTQQYQLAACNSKPI	PCCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SDSNHDPVNCSTVDQAQKIG	---	NETTQLEIIWP	NVYNRT-DHIS	--	FWDKQWYKHGTCGHPITIM
MDS9	YDYFQFTQQYQPAVCHFN	TPCRDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNSSGNDPIYCKNTTMNSTKIA	---	NLTARLEIIWP	NVLDRT-DHIT	--	FWNKQWYKHGSCGHPAIQ
MDSc	YDYFQFTQQYQPAVCNSNP	TPCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNSTGRDCKYCNPSNVTSHMLK	---	NIAQLEIIWP	NVLNRT-DHIG	--	FWERQWYKHGSCGGRPAIT
MDSf	FDYFQFTQQYQPAVCNSNP	TPCKDPPDK	---	LFTVHGLWPS	SNNGNDPEYCKAPPY	---	HTTKM-IEPQIVIIWP	NVLNKN-DHEG	--	FWRKQWYKHGSCASSPIQ

ナス科S-RNase

	*	#	*	#	*	#	*	#	*	#	
NAS2	AFEYMQVLVLTWPI	TFERIKH	---	CERT	---	PT	---	NFTIHGLWPN	HHTMELNY	---	CDRSKPYNMFTDGKKKND
NAS3	AFEYMQVLVLTWPA	AFCHTTPSPCKRI	---	PN	---		---	NFTIHGLWPN	VSTMLNY	---	CDREDEYKELDDDKKKDD
NAS6	AFEYMQVLVLTWPT	AFCHTTP	---	CKNI	---	PS	---	NFTIHGLWPN	VSTMLNF	---	CGKEDDNYIIMDGPEKN
PIS1	NFEYLQVLVLTWPA	SFCFRPKNICRPAK	---	AK	---		---	NFTIHGLWPE	ITGFRLEF	---	CTGDPKYETFDNNIVDIERHW
PIS2	NFDYFQVLVLTWPA	SFCY-PKNFCRKR	---	SN	---		---	NFTIHGLWPN	KNHFRLEF	---	CTGD-KSRPKEDNI
PHS1B	SFDHWQVLVLTWPA	GCK-VKG-CPRPVIPN	---	SN	---		---	NFTIHGLWPS	ISVIMNN	---	CDPTKTFATITEIKQITE
PHS2A	NFDYFQVLVLTWPA	SFCY-PKNKCQRR	---	SN	---		---	NFTIHGLWPE	KKHFRLEF	---	CPGDK-FSRPKEDNI
SCS2	TEDYMKLVLTWPP	MYCR-NKF-CERI	---	PR	---		---	NFTVHGLWPN	DKKYLNN	---	CRSYA-YNALTNVRE
SCS3	TTEHLQVLVLTWPT	SFCH-KER-CIRS	---	SS	---		---	NFTIHGLWPN	DTSTRLNF	---	CKIVK-XNKIEDHKLDAIE

S遺伝子座に連鎖していないRNase

	#	*	#	*	#	*	#	*	#	*
nons-RNS	QKE-YFEANIKREKVNLIQ	ILKNAGIVPN	D-ELYNLE-SIVE-AIKVGVG	HTPGIECNKDSAGN	SQLYQILCVDTSGQDI	IECPILL-PKG-R	--	CASKIQFPKP		
RNS-NE	QHG-YFKALDLKNOINLE	ILQAGINP-DGGFYSEN-SIKN-AIRSAIG	YTPGIEGNVDDSGN	SQLYQVYICVDGSGN	ILIECPVF-PRG-K	--	CGSSIEFPPTF			
RNS-LE	QHA-YFKALDLKNOIDLLS	ILQAGADHP-DGESYDEV-NIRN-AIKSAIG	YTPWICQNVDDSGN	SQLYQVYICVDGSGS	ILIECPIF-PGG-K	--	CGTSIEFPPTF			
RNS-LX	QHA-YFO-ALDFKTKSNLE	QNLNAGIKPRNGDYGVE-SIKK-AIEKGVG	HTPFGIECNVDDSGN	HQLYQVYICVDSSAS	KFIDCPIF-PHGGK	--	CGSKIEFPSP			

バラ科S-RNase #

PPS2 NQHYFETVIRMFLEAKQVSRILSMATIEP-EGKNRLLLEIQNAIRAGTTNMIPIKIKCQKVNQM--TELVEVTLCSDSNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY
PPS4 DDMHYLKTVIKMYITQKQVSAIILSKATIQP--NGNRSVLVDIENAIRSGNNNTKPKFKCQKTRTT--TELVEVTLCSDNRDLTKFINCPHGPPKGSRYFCPAN--VKY
MDS2 NDLHYFQTVIKMYITQKQVSDILSKAKIEP--DGNIRTOKEIVDAIRKGIHCKEENLKQCKNT--QMTLVEVTLCSDGNLQKQFIDCPHHFFNGSRHNCPTNHELY
MDS3 DDMHYFSFVIEEMYITKQVSEILSKAKIKP-EKKFRTRDDIVNAISQSIDYKPKIKCKNNN--QITLVEVGLCSDDNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY
MDS5 DKNHYFETVIRMYITEKQVSYILSKANINP--DGKGRTRKDIOALIRNSTNDKEPKIKCQTKN--GITLVEVSLCSNRYFGKFNINCPNKTGKTRYSCPTNDIHY
MDS7 NDIHYFQTVIKMYITQKQVSKILSKAKIEP--EGKPRKQVDIVNAIRKGTNDKEPKIKCQKNN--QVTELVEVTLCSDNRNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY
MDS9 NDMHYLQTVIKMYITQKQVSEILSKAKIEP--VGGFRTOKEIEKAIKRGKGTNNKEPKIKCQKNS--QRTLVEVTLCSDDNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY
MDSc NEVDYFQTVIKMYITQKQVSKILSKAKIEP--EGRIKMLKDIEDAIRNSTNNKPKIKCQKNS--RMTLVEVTLCSDDNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY
MDSf NOKHYFDRVIRMYITEKQVSEILSKANIEP--GRKNRPLVDIENAIRNVINNMTEPKFKCQKNTTSLTELVEVGLCSDDNLTQFINCPRLPQASPYFCFIDDIQY

C6

HV2 C7

ナス科S-RNase #

NAS2 REQYFDLAMTIRDKFDLLSLRNHGISRGS-YTVQNLNNTIKAITGGF-----PNETQSRL-----RELKEIGICFDETVKNVIDCPNPKT-----CKPT-NKGMFEP
NAS3 LTQYFDLAMALKDKFDLITSLRKHGIIPGNS-YTVQKINSTIKAITQGY-----PNETSCTKR-----QMELEIGICFDSKVKNVIDCPHPKT-----CKPMGNRGKIFP
NAS6 QVQYFRLAMALKDKFDLITSLKNGHGIIRGYK-YTVQKENNTIKTWTQGY-----PNETSCTKG-----QELNEVGICFDSAKNVIDCPNPKT-----CKTASNQGIMFEP
PIS1 QKAYFLLATRLKEKFDLITLTHRGITPGTK-HTFGDIQKAIKTVTNQV-----DDELKQVEH-IKGVQELNEIGICFNPAADNFYPCHHSYE-----CDETDSDKMILFR
PIS2 QEAYFLLATRLKDKLDLITLTHRGITPGTK-HTFGEIQKAIKTVTNNK-----DDELKQVEN-IKGVKELNEIGICFNPAAD-FHDCRHSKT-----CDETDSTATLERR
PHS1B QSAYFDFAIKLDKTDLLSILRSQGVTPGST-YTGERINSSIASVERVK-----PNEKCLY--RGLLELTEIGICFDRTTVAMNSCPRISTS-----CKFGTNARITERR
PHS2A QKAYFLLATRLKDKLDLITLTHRGITPGTK-HTFGEIQKAIKTVTNNK-----DDELKQVEN-IKGVKELNEIGICFNPAADSFHDCRHSYE-----CDETDSTQTLERR
SCS2 QAOYFNEITMNEKDKFDLIRILRNHGIVPGSL-ALLSNSGRPLRQLTNKV-----PSELKCIDNN--GIMEILEVGICFDPAAATKVPICHRPWI-----CHADENTRIELVK
SCS3 KDAYFDLAMLEKDRFDLILKILAMHGITPGTSHHSSNIQNAVKSVTQGV-----PHVTGFNNRPFKGTSELLEIALCFDPPQAQNVIHCPRPKT-----CNSKGTGKGTFFP

C4

C5

HV4

HV5

S遺伝子座に連鎖していないRNase

RNS-LX STNDDHDEF

Fig.13 ナス科、バラ科のT2型RNaseの一次構造の比較

#は全てのRNaseに共通に存在する残基、*は保存されているCys残基、C1~C5、HV1~HV5はそれぞれ保存領域と可変領域を示す。

nonS-RNS : ニホンナシ(*P.pyrifolia*) non-S-RNase、RNS-NE : タバコ(*N.alata*) RNase NE、RNS-LE : トマト(*L.esculentum*) RNase LE、

RNS-LX : トマト(*L.esculentum*) RNase LX、PP : ニホンナシ(*P.pyrifolia*)、NA : タバコ(*N.alata*)、PI : ペチュニア(*P.inflata*)、

PH : ペチュニア(*P.hybrida*)、SC : ジャガイモ(*S.chacoensis*)

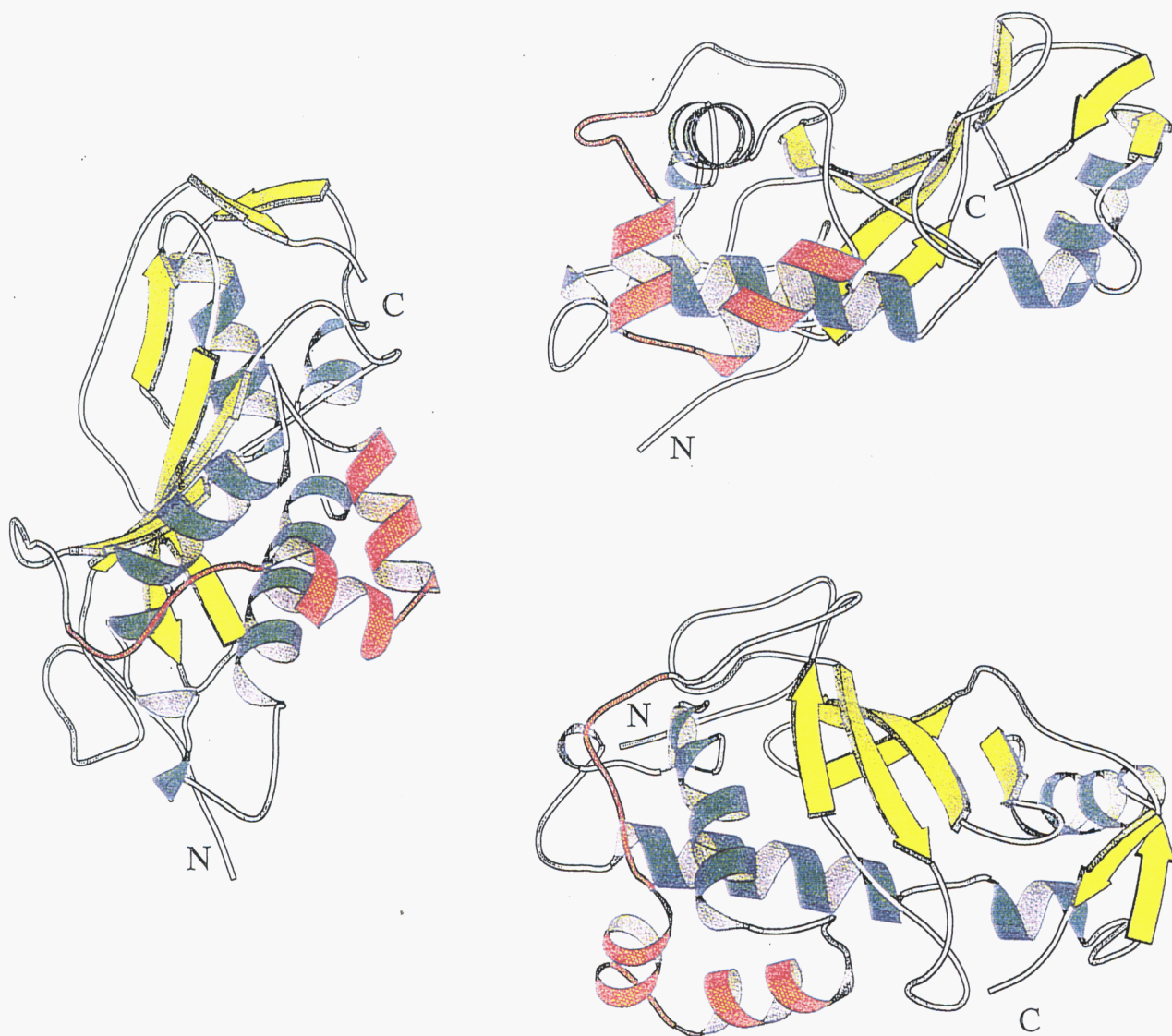


Fig.14 RNase Rhの立体構造モデル
赤で示した部分がS4-RNaseのHV1領域に相当する。

ニガウリ種子 (5)、キュウリ種子 (55) でも見いだされている。これらのRNaseの生体内での役割はわかっていないが、リン酸欠乏下で発現されるものもあり (46、49-52)、リン酸供給のためのRNAの分解に関わっているのではないかと推測される。

S₂-RNase、S₄-RNaseの相同性は60%と高いが、S-RNaseとnon-S-RNase間の相同性は25%と低い。バラ科の場合、S-RNase間の相同性は、S-RNaseとnon-S-RNase間の相同性に比べて非常に高く、S-RNase間、S-RNaseとnon-S-RNase間の相同性にほとんど差のないナス科と対照的である。植物由来のT2型のRNaseについての系統樹より (30、46)、ナス科、バラ科のS-RNase、non-S-RNaseはそれぞれsubfamilyを形成していることがわかる。また、ナス科、バラ科のS-RNaseの中には同じ種間のS-RNaseとよりも、他の種のS-RNaseとの方が相同性の高いものがあり、進化的には、non-S-RNaseが分かれた後、S-RNaseに多様性が現れ、その後にそれぞれの属に分化していったと考えられる。

第三章 Non-S-RNase、S2-RNase、S4-RNaseのmRNAのノーザン分析

序論

S-RNaseは、ナス科では花柱から子房にいたる花粉管通導組織の細胞に局在しており、組織特異的な発現を示す(56)。また、S-RNaseの発現の時期は花の成熟に伴う自家不和合性の発現時期と一致している。ニホンナシの場合も二十世紀のS2-RNase、S4-RNaseはpink bud期からwhite bud期にかけて合成されはじめ、balloon期には最大量に達するが、これは自家不和合性に関わる因子としての条件を満たしている。本章では、mRNAも蛋白質の発現時期に呼応して発現しているかどうかを調べるため、花の成熟過程の各段階の花柱より全RNAを抽出しノーザン分析を行った。また、mRNAの発現時期を調べることにより、発現の制御が転写、翻訳、どちらのレベルで起こっているのかも明らかになると考えられた。

実験材料と実験方法

実験材料

二十世紀 green bud (810花分)、pink bud (550花分)、white bud (431花分)、balloon (502花分)、mature flower (520花分) は第二章で述べた様に採集し、液体窒素下で保存しておいたものを用いた。

AmpliTaq^R GoldはPerkin Elmerから、Gene CleanIIキットはBio101 Inc.から、Hybond Nは Amershamから、ノンラジオアイソトープDIGー核酸検出システムのDIG DNA標識および検出キットはベーリンガーマンハイムから購入した。

全RNAの調製

全RNAは第二章で述べた方法により調製した。

プローブの作製

プローブには第二章で得られたS2-RNase、S4-RNaseのcDNA、およびおき二十世紀から得られたnon-S-RNaseのcDNA (翻訳開始Metからの全長のオープンリーディングフレームを含む) の塩基配列に基づきそれぞれに特異的なオリゴヌクレオチド、S-03、S-05、S4-1、nonS-3、nonS-4を合成し、それらをプライマーとしてPCRを行い増幅したDNAフラグメントを用いた。オリゴヌクレオチドの塩基配列、およびPCR条件を以下に示す。

S-03	5'-AGTAATTAAT(C/T)TGCCTCGC-3'
S-05	5'-GAGTTTTAATTGATTAAGCC-3'
S4-1	5'-CCACCACCTATACTACTTG-3'
nonS-3	5'-GAGAGACAATGAGATACAGC-3'
nonS-4	5'-TGAAAGCAACATCGGTAGCC-3'

PCR反応の条件

反応溶液 50 μ l (30ng テンプレートDNA、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP混合液、2.5U AmpliTaq^R Gold DNA ポリメラーゼ、15pmol プライマー)

反応条件

95°C	9分	
94°C	30秒	} 25サイクル
50°C	30秒	
72°C	1分	
72°C	10分	

PCR反応はPerkin ElmerのGene Amp PCR System 2400を用いて行った。PCR産物は6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動でDNA鎖長を確認後、1.5%アガロースゲル電気泳動でDNAフラグメントを分離し、Gene Clean IIを用いてゲルより回収した。得られたDNAフラグメントは、DIG-DNA標識キットのマニュアルに従ってDIG標識した。

ノーザン分析

10%ホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルで1レーンあたり10 μ gの全RNAをアプライし、30V 1時間、50V 1時間、60V 1時間泳動し、常法に従って、RNAをナイロンメンブレンにトランスファーし、UV照射により固定した。

メンブレンは、ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、5xSSC、2% ブロッキング試薬、0.1% サルコシル、0.05% SDS) 中、42°Cで3時間インキュベートした後、DIG標識したプローブを含む同溶液で42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、0.1% SDSを含む2xSSCで室温で5分ずつ2回、0.1% SDSを含む0.1xSSCで65°Cで15分ずつ2回洗った後、キットのマニュアルに従って検出を行った。

結果と考察

ノーザン分析の結果をFig.15に示す。S2-RNase、S4-RNase共にシグナルはpink bud期から現れ、white bud期で最も強く、その後、徐々に弱くなっている。これは二次元電気泳動の結果得られたS2-RNase、S4-RNaseの発現量の推移とよく対応している。S-RNaseのmRNAは、pink bud期から合成されはじめwhite bud期で最大量に達するが、S-RNaseもそれに応じて、時間的には少し遅れてではあるが、pink bud期からwhite bud期にかけて合成がはじまり、balloon期には最大量となって、以降の自家不和合性反応に備えと考えられる。pink bud期からballoon期にかけての時期は開やくの1-3日前にあたり、自家不和合性を獲得する時期と一致しており(57)、ニホンナシでもナス科植物と同じようにS-RNaseが花柱側の自家不和合性に関わる因子となっていると考えられる。S-RNaseのmRNAは、balloon期から減少し始め、mature flowerではほとんど検出されていないが、蛋白質もballoon期で最大量に達するものの、mature flowerでは減少してくる。このように、S-RNaseのmRNAと蛋白質の発現時期が一致していることは、発現の調節が転写の段階で起こっていることを示唆している。

Non-S-RNaseのmRNAはwhite bud期で最も多いが、その量はS-RNaseに比べ非常に少ない。これはballoon期からmature flowerにかけてnon-S-RNaseの蛋白量がS-RNaseの蛋白量の20分の1という結果と一致する。開花時には、花柱内の花粉管誘導組織の細胞は収縮し花粉管が伸長していくための細胞間隙が形成されるが、このとき細胞内部は液胞化し細胞小器官は崩壊する(58)。Non-S-RNaseはこれらの分解反応に関わっているのかもしれない。

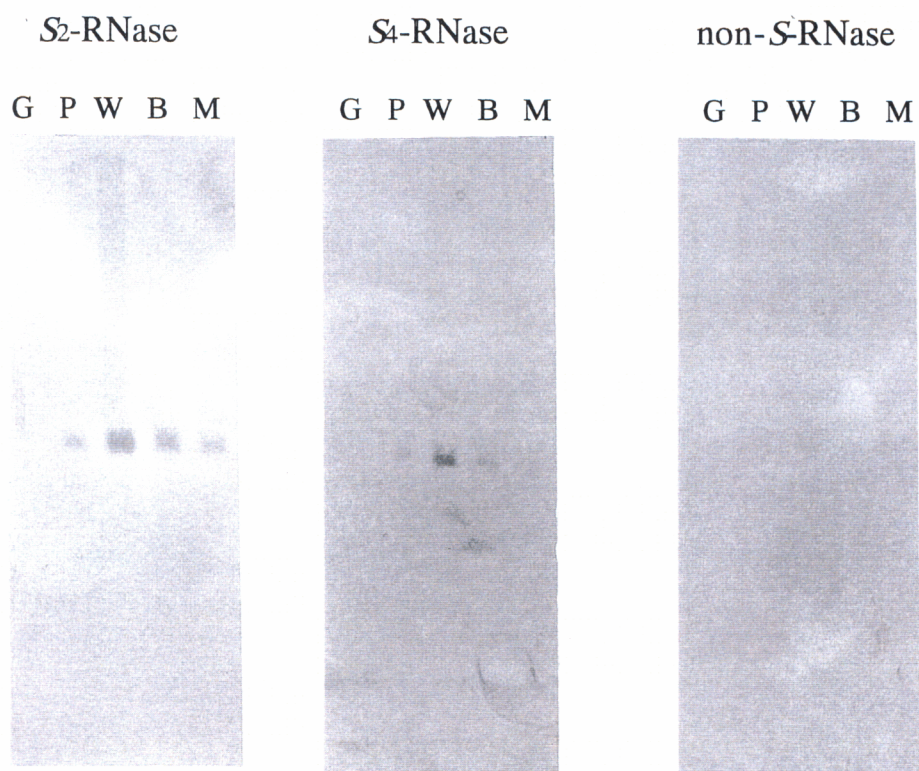


Fig.15 二十世紀花の成熟過程におけるnon-*S*-RNase、*S*₂-、*S*₄-RNaseのmRNAの花柱での発現パターン

G: green bud P: pink bud W: white bud B: balloon M: mature flower

第四章 二十世紀S2-RNase、S4-RNaseのゲノム遺伝子のクローニング

序論

二十世紀花柱に存在するnon-S-RNase、S-RNaseについて、第二章、第三章ではそれらのcDNAのクローニング、mRNAの発現状態を調べてきた。本研究の目的のひとつはおさ二十世紀の和合性の原因を究明することであるので、雌しべ側のS4遺伝子が突然変異しているとされるおさ二十世紀のどの遺伝子に変異が起きているかを調べ、変異する前後の遺伝子の構造を明らかにすることにした。そこで、二十世紀のS2-RNase、S4-RNaseのゲノム遺伝子の構造を明らかにすることにし、両RNaseのゲノム遺伝子のクローニングを行った。5'-、3'-側の非翻訳領域やイントロン部分の塩基配列から、S-RNaseの発現調節に必要なプロモーター領域やニホンナシのS-RNaseに特徴的なゲノム構造、S-RNase近傍にコードされている遺伝子についても何らかの知見が得られるのではないかと期待された。また、これまでに報告されているナス科のS-RNaseゲノム遺伝子の構造と比較することで、バラ科とナス科それぞれのS-RNaseのゲノム遺伝子の特徴が明らかになることも予想された。

実験材料と実験方法

実験材料

ゲノムDNAは、第二章で述べた通り採集し、液体窒素下で保存しておいた二十世紀のwhite bud期の花柱から調製した。

ゲノム遺伝子の調製

ゲノム遺伝子の調製はMurray とThompsonの方法 (59) の改変法 (60) で行った。二十世紀white bud期の花柱550花分を液体窒素下、乳鉢で粉碎し、70℃で保温しておいた抽出用緩衝液 (9.5ml 2xCTAB、30mg/ml ポリクラーAT、5% メルカプトエタノール)を加え55℃ 10分放置した。等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1 v/v) で処理した後、1/10量の10% CTAB、等量の沈殿用緩衝液 (1% CTAB、5mM トリス塩酸 (pH8.0)、10mM EDTA)を加え、DNAを沈殿させた。遠心して回収したDNAを1M NaCl-TEに55℃で溶解し、イソプロパノールで再び沈殿させ、70% EtOHで洗った後、TEに55℃で溶解し、1/10量の10µg/ml RNaseを加え55℃ 30分消化させた後-20℃で保存した。

ゲノミックサザンハイブリダイゼーション

ゲノミックDNA3µgずつをそれぞれEcoRI、EcoRV、BamHI、HindIII、PstIで37℃で一晩消化し、0.7%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動用緩衝液は1xTAEで30Vで2時間、40Vで2時間泳動し、常法に従って、ナイロンメンブレンに転写しUV照射によってDNAを固定した。

メンブレンは、ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、1% SDS、4xSSPE、5xDenhardt's 溶液、500µg/ml 変性サケDNA)中42℃ 3時間インキュベートした後、RI標識したプローブを含む同溶液で42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。S₂-RNase、S₄-RNaseのプローブはそれぞれのcDNAよりプライマーS-03とS-05でPCR増幅させたDNAフラグメントを、BcaBEST™を使ったランダムラベリング法で³²Pラベルして用いた。ハイブリダイゼーション後、0.1% SDSを含む0.1xSSCで室

温で30分ずつ3回洗った後、intensify screenを用いて、 -80°C で一日オートラジオグラフィを行なった。

ゲノミックライブラリーの構築

二十世紀ゲノムDNA66 μg をEcoRIで完全消化し、0.8% アガロース電気泳動によってDNAフラグメントを分画し、5mm間隔でゲルを切って各ゲル片よりDNAを抽出した。どの分画にS2-RNase、S4-RNaseのゲノムDNAが含まれているかは、サザンハイブリダイゼーションを行なって確認した。サザンハイブリダイゼーションの条件は上記の通りである。ポジティブ分画のDNAフラグメント（S2-RNaseはフラクション#4、S4-RNaseはフラクション#4とフラクション#5）を λ gt10のEcoRIサイトに組み込み、第二章で述べたようにPackaging INNを用いてそれぞれのライブラリーを構築した。

ゲノミックライブラリーのスクリーニング

スクリーニングはすべて第二章と同じ条件で行なった。S2-RNaseについてはフラクション#4のライブラリーを約3万プラーク、S4-RNaseについてはcDNA内部にEcoRIサイトが一カ所あるため、フラクション#4とフラクション#5の2フラクションをそれぞれ約3万プラーク、5万プラークスクリーニングした。プローブは、S2-RNaseについてはS2-RNaseのcDNAをプライマーS-03とS-05でPCR増幅させたものを使ったが、S4-RNaseについてはプライマーS4-1とS4-3、S4-4とS-05を用いて新たに作製したプローブを用いた。S4-3、S4-4の塩基配列を以下に示す。

S4-3 5'-GAATTCATGGTTGTAGTC-3'

S4-4 5'-ATAGGAAATATGACAGCCC-3'

フラクション#4はS4-RNaseのcDNAをプライマーS4-4とS-05で、フラクション#5はプライマーS4-1とS4-3でPCR増幅させたDNAフラグメントを使ってスクリーニングを行なった。PCRの条件は以下の通りである。

反応溶液 50 μ l (15ng *S4*-RNase cDNA、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、50mM KCl、
1.5mM MgCl₂、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2mM dNTP混合液、
2.5U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ、15pmol プライマー)

反応条件

94°C	2分	
94°C	40秒	} 25サイクル
48°C	1分	
70°C	2分	
70°C	10分	

PCR反応はHYBAID™ Thermal Reactor (Hook & Tucker Instruments)を用いて行なった。

DNAシーケンシング

得られたクローンはM13mp19またはpUC118にサブクローニングし、BcaBEST™ DNA sequencing kitを用いて、島津シーケンサーDSQ-1でDNAシーケンシングを行なった。なお、*S2*-RNaseは主に*Sau*3AI、*Eco*RV、*Xba*Iで断片化し、長いフラグメントはさらに*Dra*Iで短いフラグメントにした後にシーケンシングを行った。*S4*-RNaseは、主に、*Hind*III、*Afa*I、*Eco*RI、*Sau*3AI、*Xba*Iで断片化し、長いフラグメントはさらに*Pma*CI、*Hae*III、*Hinf*I、*Alu*Iで短いフラグメントにした後にシーケンシングを行った。

結果

ゲノミックサザン分析

ゲノミックサザン分析の結果、S2-RNaseは*Eco*RI消化物に2.8kb、*Eco*RV消化物に2.0kbと1.3kb、*Bam*HI消化物に2.0kb、*Hind*III消化物に5.2kb、*Pst*I消化物に13kbのポジティブバンドを示した (Fig.16-a)。また、S4-RNaseは*Eco*RI消化物に2.6kbと1.5kb、*Eco*RV消化物に13kb、*Bam*HI消化物に>23kb、*Hind*III消化物に2.1kb、*Pst*I消化物に>23kbのポジティブバンドを示した (Fig.16-b)。S2-RNaseのcDNA、S4-RNaseのcDNAはそれぞれ内部に*Eco*RV、*Eco*RIのサイトを持つため、これらの酵素の消化物は2本のポジティブバンドを示したが、その他の酵素消化物はシングルバンドを示し、S2-RNase、S4-RNaseはゲノム中にシングルコピーで存在することが確認された。

ゲノミックライブラリーのスクリーニングと得られたクローンの塩基配列

a) S2-RNaseのゲノム遺伝子

サザン分析の結果、S2-RNaseのゲノム遺伝子は約2.8kbの*Eco*RIフラグメント上にあり、二十世紀ゲノムの*Eco*RI消化物のフラクション#4に含まれていることがわかった。このフラクション#4について部分ライブラリーを作製し、3万プラークをスクリーニングしたところ、2個のポジティブクローンが得られた。それらをM13mp19の*Eco*RIサイトにサブクローニングし、シーケンシングを行なった。その結果、S2-RNaseのゲノム遺伝子は2704bpの*Eco*RIフラグメント上にあり、1153bpのイントロンを含んでいることが明らかとなった (Fig.18)。S2-RNaseのゲノム遺伝子の制限酵素マップをFig.17-aに示す。各塩基の含有率は表2の通りだが、GC含有率は5'-、3'-側の非翻訳領域で平均36.5%、翻訳領域で42.6%、イントロンで28.2%と明らかな差が見られた。

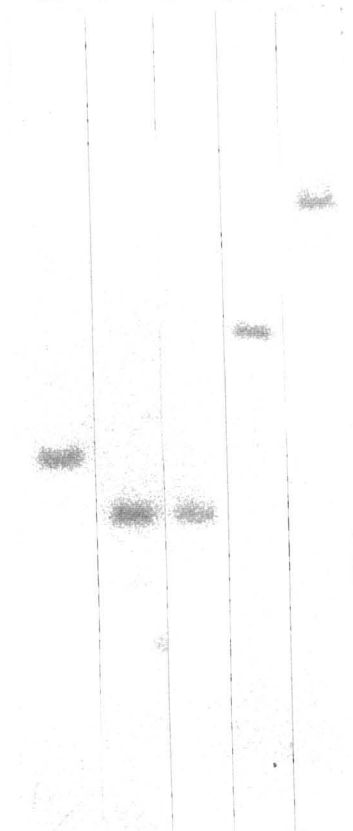
b) S4-RNaseのゲノム遺伝子

S4-RNaseのcDNA内部には*Eco*RIサイトが一カ所あり、サザン分析の結果、2.6kb、1.5kbの2本のポジティブバンドが得られ、それぞれ*Eco*RI消化物のフラクションの#4、#5に含まれていることがわかった。どちらのフラクションに5'-側のフラグメントが

含まれているかを調べるため、各々のフラクシオンについて、5'-側のフラグメントを増幅させるためのプライマーS4-1とS4-3でPCRを行ったところ、フラクシオン#5から相当する約300bpのフラグメントが増幅された。そこで、この約300bpのフラグメントをプローブとして、フラクシオン#5の部分ライブラリーを5万プラークスクリーニングしたところ、2個のポジティブクローンが得られた。次に、3'-側のフラグメントを増幅させるためのプライマーS4-4とS-05でcDNAをPCR増幅させたフラグメントをプローブとして、フラクシオン#4の部分ライブラリーをそれぞれ3万プラークスクリーニングし、1個のポジティブクローンを得た。得られたクローンはM13mp19またはpUC118にサブクローニングし、シーケンシングを行った。また、両フラグメントのつながりは、ゲノムよりプライマーS-01とS-02でPCR増幅させたフラグメント(イントロン部分を含む)の塩基配列と比較することで確認した。その結果、S4-RNaseのゲノム遺伝子は4992bpのEcoRIフラグメント上にあり、168bpのイントロンを含んでいることがわかった(Fig.19)。S4-RNaseのゲノム遺伝子の制限酵素マップFig.17-bに示す。S2-RNaseの場合と同様、各塩基の含有率を計算してみると(表2)、GC含有率は5'-、3'-側の非翻訳領域で平均36.8%、翻訳領域で41.8%、イントロンで23.2%と明らかな差が見られた。5'-側の非翻訳領域には約100bp、30bpの繰り返し配列があり(Fig.19)、3'-側の非翻訳領域には、cDNAに見られたGTの繰り返し配列がその773bp3'-側に見られたが、ここではGTが17回繰返されていた。

a) *S2*-RNase

E V B H P



b) *S4*-RNase

E V B H P

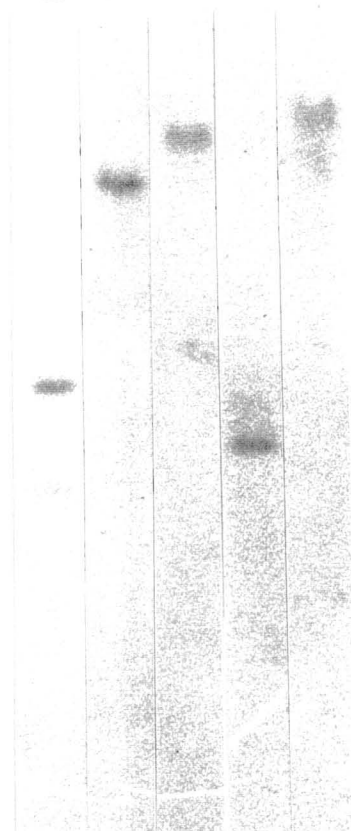
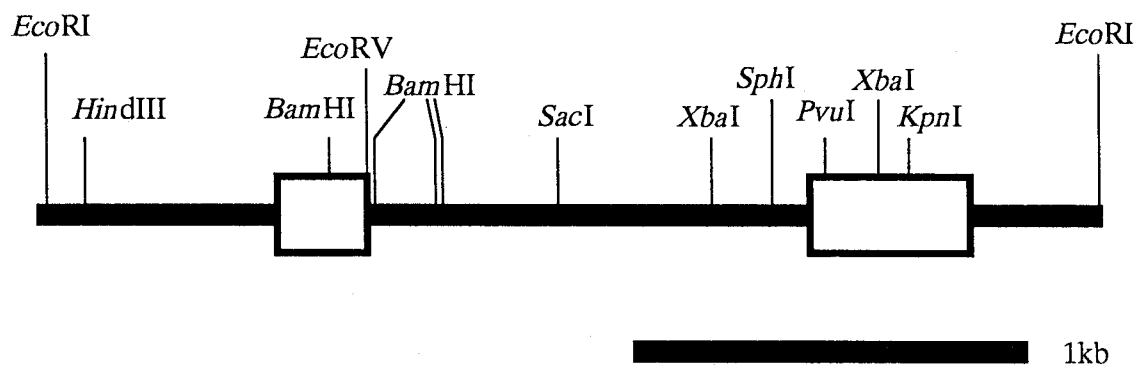


Fig.16 二十世紀のゲノミックサザン分析

E : *EcoRI* V : *EcoRV* B : *BamHI* H : *HindIII* P : *PstI*

a) *S2*-RNase



b) *S4*-RNase

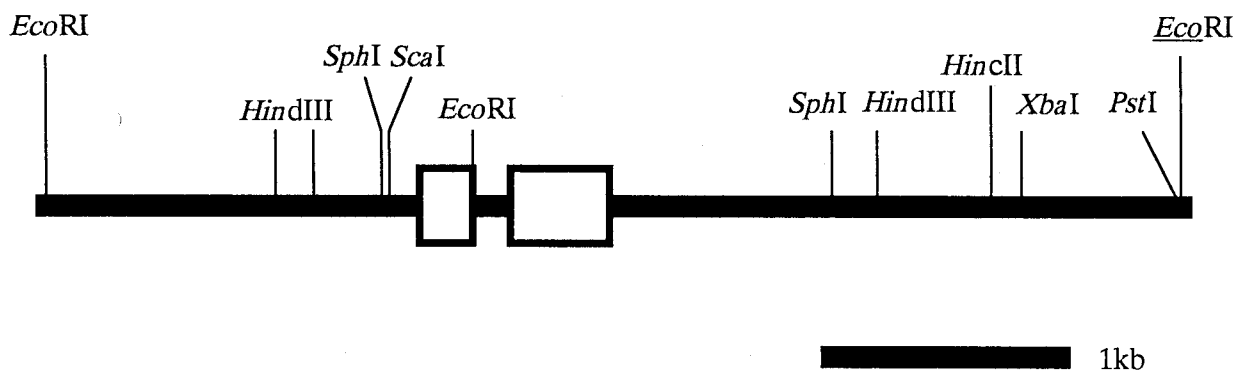


Fig.17 *S2*-RNase、*S4*-RNaseのゲノム遺伝子の制限酵素サイトマップ



は翻訳領域を示す

		G	A	T	C	G+C	A+T
5'-non coding region	S ₂ -RNase	16.9%	34.2%	31.7%	17.2%	34.1%	65.9%
	S ₄ -RNase	18.9%	31.4%	32.4%	17.3%	36.2%	63.8%
3'-non coding region	S ₂ -RNase	19.9%	30.3%	30.6%	19.2%	39.1%	60.9%
	S ₄ -RNase	17.3%	33.0%	29.7%	20.1%	37.4%	62.3%
intron	S ₂ -RNase	15.5%	36.1%	35.7%	12.7%	28.2%	71.8%
	S ₄ -RNase	11.9%	34.5%	42.3%	11.3%	23.2%	76.8%
coding region	S ₂ -RNase	20.7%	30.8%	26.6%	21.9%	42.6%	57.4%
	S ₄ -RNase	20.7%	33.0%	25.2%	21.1%	41.8%	58.2%

表 2 S₂-、S₄-RNase遺伝子とその5'-、3'-非翻訳領域における各塩基の含有率

```

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
5'gaattccagtttgattgaggaggtattgagtgatgattggataattaggaataacttggtaatgccaaagtgtcatcatctagtagacttagtttagagagaaaaagcttactcataa
gctactagattactataaaataccagacaagaactataattgtaaagttagttttgagaatacaataactctctcgcaatttctcttctcttagttcatacttcttcttcttcttca
tttctggtatggtatgacacatgactagtttgaatagaaacacacacatatgatcaaatacatgtgatcaagatgatcaactaaggcattgcacatgactagtttgaataaaaaaatattg
gagaaaaagtagctatcaatttatagaacatgtgatcgagtacaaagtgatcggtggtcaattacaactatttgatacaacccttatttatggacgaatgtacgcatatgcctacaa
ccagaaccacaagaataagagcctgatgtatctccaattgatccacaccacgcccactacttcaaatggaggaatagtaataatttgctcgtcttgaacaaaattattattcaA
TGAGGATTACGGGGATGATATATATTTTACGATGGTATTTTCAATTAATGTATTATTCGTCGCGCGGAGATACGATTAATTTCAATTTACGACGAATATCAGCAGGCTT
M R I T G M I Y I F T M V F S L N V L I L S S A A R Y D Y F Q F T Q Q Y Q Q A
TCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTGAAGGATCCTCCTGACAAAGTTGTTTACGGTTTACGGTTTGTGGCTTCAACCAAGTAGGACGTGACCCAGATAATTTGCAAGACAAAGAGATATC
F C N S N P T P C K D P P D K L F T V H G L W P S T K V G R D P E Y C K T K R Y
GGAAGgtaataagtgcaaaaggatccttttcggattccttccatcaaatctccccagcaacaactctgagttcttgaatttgatccaacgctaaagtattattataactttttaaagt
R K
gggcccattattgtaactgttagatcaaaatttcaaatgctcggattagttgatcgaaaggatcggaaggatccctttcttataaagtaatacagatagccaatat
tggttatttaattatgttctcgtgtgtgtgcatgtgtataatataatgaataatgttagaagatgagaaattaatgaaaaagcgttttaaaattttgaattttaacaaaaaaatcatc
taataactttatttaatttaaaagacaaaaataaaagaaaaaagaaaaatcccaacaaagcagtgagggcgttaagccaatccatgttcagtttttgaaaatagtcaatttaa
gaatagtagtactgtatctagattcagaaaatagtcagtttagaaaataatgaagtagtaccagttgttttagtttagaaaaatagtgacaaataccagttgttttgtaaagaattgtgataa
taccctgttttaggttttaaaaaataatcaggtgttcagcttaagaaaaatagtagtaccatattcaatttaagaaatagtcagttccaaatttaaaagtttaagacattttcattaaataagt
tgtgtgtgatggcgcagcgtgtaccccgcatcaaatttttatttattaaacatttttaaaattccattaaatttaagttcttttccataaaaaagtttaagacattttcattaaataagt
tattagatgattttttttttttgttaataaaaaagtttgagatgctctttttgttagagctcctaatttttagaccacaaatagtagtgcactaatagatatacctcaaatgttttacaaa
taagtaatgatctaattatcaatcactacatttttttaattacaaaatttggttttactattatcctatttttttaataataataataactcagcattattttcatgcattgcgttttacaaa
tattacaattaatcgtatttattctatatattgttatatgggtacgccttttatcttatacaaaaaaaataattatcagATACAAAGACTCGAACCCAGTTGGAAATTTATTTGGCCGAAC
I Q R L E P Q L E I I W P N
GTATCCGATCGAAAAGCTAATCGAGGCTTCTGGCGTAAACAGTGGTACAAACATGGCTCTCCCGCATTTGCCGAACACAGAAAGCATTTACTTTGAAACAGTAATCAGAAATGTTTC
V S D R K A N R G F W R K Q W Y K H G S C A S P A L P N Q K H Y F E T V I R M F
TTAGCTGAGAAAACAAAACGCTCTCTAGAAATCCTCTCAATGGCGACGATTGAACCGGAGGGGAAAACAGGACACTGTTGGAAATTCAAAATGCCATACGCGCTGGTACCAACAATATGATA
L A E K Q N V S R I L S M A T I E P E G K N R T L L E I Q N A I R A G T N N M I
CCAAAACTCAAGTGCCAAAAGGTTAATGGGATGACTGAATTTGGTTGAGGTCACCTCTTTGCCACGATAGCAACTTAACGCGAGTTTCATAAAATTTGCCCGCCGCTATTTGCCACAAGCATCACCA
P K L K C Q K V N G M T E L V E V T L C H D S N L T Q F I N C P R P L P Q A S P
TATTTCTGCCCCATTTGATGATATATTCAGTATTAAGagctagtatataataagaagttggcctaataacggtggcatttccatatataggacgaggaatgcagttacatatatttctgcct
Y F C P I D I Q Y *
gtgattgtacttctaataatgaataaaattggcttaataatcaataaaaaactcttgtgaattgccaatgttctttaaattccccgggtacagtcattcgaaaaagtcctccaggagataactcccgtagca
atttttgcaaaagctgaagaaatgtctacaggttaagcaccgtattgtgtgttgccatctacgctccgtcatgaattc 3'

```

Fig.18 S₂-RNase ゲノム遺伝子の塩基配列

*は停止コドンを示す。

考察

ゲノミッククローニングの結果、S₂-RNaseのゲノム遺伝子は2704bpのEcoRIフラグメント上にあり1153bpのイントロンを含んでいることが、S₄-RNaseのゲノム遺伝子は4992bpのEcoRIフラグメント上にあり168bpのイントロンを含んでいることがわかった。最近ニホンナシの長十郎、幸水からS₃-RNase、S₅-RNaseのゲノム遺伝子がクローニングされ (61)、4種のニホンナシS-RNaseのゲノムの比較が可能となった。

まず、イントロンを比較すると (Fig.20)、長さは大きく異なるが、GC含有率はS₂-RNase遺伝子は28.2%、S₃-RNase、S₅-RNase遺伝子は25%、S₄-RNase遺伝子は23.2%と非常に低く、植物のイントロンはGC含有率が非常に低い (平均26%) (62) という事実と一致する。また、イントロンの両端はGT-AGルールを満たしており、5'-側のスプライシングサイト付近はGAAGgtaatat(a/t)aであり、これはさらに、双子葉植物のイントロンの5'-側のスプライシングサイト付近に見い出された (A/T)Ggtaag(t/a)₄ (63) とよく一致している。3'-側のスプライシングサイトには、S₂-RNase、S₄-RNase遺伝子ではa(a/t)aa(a/t)(a/t)atatt(a/g)tcagATAの共通配列があるが、これも双子葉植物に見い出された(t/a)₂n(t/a)₇t(g/a)(c/t)ag (63) とよく一致している。また、イントロンの鎖長は1153bp (S₂-RNase遺伝子)、179bp (S₃-RNase遺伝子)、168bp (S₄-RNase遺伝子)、182bp (S₅-RNase遺伝子)と異なるものの、S₃-RNase、S₄-RNase、S₅-RNase遺伝子の塩基配列はすべてS₂-RNase遺伝子の配列の一部と相同性があり、イントロン部分だけが独立に欠失または挿入によって変異を重ねてきたのではないかと考えられる。

S₂-RNase、S₄-RNase遺伝子ともイントロンは一次構造上、HV1可変領域内のLys57-Ile58間に、S₃-RNase、S₅-RNase遺伝子のイントロンは同じくHV1可変領域内のLys55-Arg56間にあり、これは同じバラ科のリンゴのS₂-RNase (138bp)、S₃-RNase (約1100bp)、S₅-RNase (約1100bp) 遺伝子のイントロンと同じ位置にある (64、29)。ナス科のタバコ (S₂-RNase、S₆-RNase) (65)、ペチュニア (S₁-RNase、S₃-RNase) (66)、トマト (S₁₁-RNase、S₁₂-RNase) (67)、ジャガイモ (S₂-RNase) (68)でもS-RNase遺伝子のイントロンはHV2可変領域内の対応する位置にあり、S-RNaseのゲノムに共通の配置と

思われる。また、イントロンの長さはナス科の*S*-RNase遺伝子では100bp前後だが、バラ科の場合は100bpより長い傾向にあり、1000bp以上に達することもある点が特徴的である。

4つの*S*-RNase遺伝子の5'-側の非翻訳領域を比較すると (Fig.21)、翻訳開始Metより5'-側に約340bpにわたって70%という非常に高い相同性を示す領域の存在が見いだされた。当初*S*₂-RNase、*S*₄-RNase遺伝子のTATAボックスと考えていたTTATTTAT (−165位) は*S*₃-RNase、*S*₅-RNase遺伝子では保存されておらず (TT(C/T)TTTAT)、−118位のTATAAATATAAの可能性もあるが、この配列は*S*₂-RNase遺伝子では保存されていない。CAATボックス (−190位) と思われる配列 (TCAAT) は4つの*S*-RNase遺伝子で保存されており、この領域はニホンナシの*S*-RNaseの発現調節に関わっているプロモーター領域ではないかと推定される。ナス科の*S*-RNaseのゲノム構造についてはいくつか報告されており (65-68)、タバコの*S*₂-RNase、*S*₆-RNase遺伝子の1kb上流と*S*₆-RNase遺伝子の600bp下流に400bpの70%の相同性のある配列が存在するが (65)、いずれも翻訳領域のすぐ5'-側にはニホンナシ*S*-RNase遺伝子に見られるような広範囲にわたったはっきりした相同性領域は見つかっていない。また、ナス科のいくつかの*S*-RNase遺伝子の上流に存在するACATAAT–ATTATGT配列は見いだされなかったが、ペチュニアの*S*₁-RNase、*S*₃-RNase遺伝子の5'-側非翻訳領域に見いだされたATGTGTCAと相同性のある配列、ACATATGATCAA、ACATGTGA(T/G)CAA、ACATGTGATC(A/G)Aがそれぞれ翻訳開始Metより5'-側−225、−210、−123位に存在しており、種を越えて*S*-RNaseの発現に関与しているのかもしれない。

*S*₂-RNase、*S*₄-RNase遺伝子の3'-側非翻訳領域は、mRNAに転写される部分より下流ではほとんど相同性はないが (Fig.22)、mRNAに転写される部分は*S*₄-RNase遺伝子のGTの繰り返し構造を除いて80%と相同性は高く、ポリA付加シグナルと見られる配列、AATAAA、AATTAAAAも双方で同じ位置に存在する。これらの配列はリンゴの*S*-RNaseのcDNAの3'-側非翻訳領域でも保存されており、バラ科の*S*-RNase遺伝子の特徴とも思われるが、*S*₃-RNase、*S*₅-RNase遺伝子ではこの3'-側非翻訳領域で保存されている部分に35bpのインサクションがあり、他のバラ科の*S*-RNase遺伝子間ほどは相同性は高くない。ナス科の場合は3'-側非翻訳領域には相同性はほとんどなく、ポリA付加シグナルの位置もそれぞれの*S*-RNase遺伝子によってばらばらである。

以上のことから、ニホンナシの*S*-RNase遺伝子の構造は次のようなものと考えられる。

i) 5'-非翻訳領域に翻訳開始Metに隣接して350bpの非常に相同性の高い部分がある。

これは*S*-RNase遺伝子の発現調節に関わるプロモーター領域ではないかと思われる。

ii) HV1可変領域にイントロンがあり、その鎖長は100bpから1000bp以上にわたっている。

iii) 3'-側の非翻訳領域には、停止コドンと後に続く90bpの相同性の高い部分にはさまれて、おのおのの*S*遺伝子型に特有のGTやATの繰返し配列が存在する。

iv) 上記の5'-非翻訳領域の上流、3'-非翻訳領域の下流にはほとんど相同性がない。

v) 5'-、3'-側の非翻訳領域、翻訳領域、イントロン部分のGC含有率は明らかに異なり、それぞれの構造上の特徴となっている。

ナス科の*S*-RNase遺伝子では、イントロンは可変領域の、ニホンナシLys57-Ile58 (Lys55-Arg56) に相当する位置に挿入されているが、ニホンナシに見られるような5'-側の非翻訳領域の広範囲にわたった相同性の高い領域や、3'-側の非翻訳領域の相同性配列、マイクロサテライト様構造は存在しない。このように5'-、3'-側非翻訳領域の相同性が低いことから、染色体上のこの領域での組換えが抑制されているものと思われる。

タバコやペチュニアの*S*-RNase遺伝子の上流、下流には反復配列が数多く見い出されており (65、66)、*S*-RNase遺伝子はこれらの反復配列の間に埋め込まれたように位置していると考えられている。ニホンナシの*S*-RNase遺伝子についても、*S*₄-RNase遺伝子の5'-側約1500bpあたりに100bpほどの反復配列が見つかっており、ナス科と同様に反復配列の間に埋め込まれたゲノム構造をとっているものと思われる。

[illegible]

Fig. 22 ニホンナシ S2-, S3-, S4-, S5-RNase 遺伝子の 3'-非翻訳領域の比較
下線は停止コドンを示す

第五章 二十世紀、おさ二十世紀のS4-RNaseゲノム遺伝子の解析

序論

自家和合性品種おさ二十世紀の花柱では、S4-RNase蛋白質が検出されず、cDNAもクローニングされなかった。また、花柱より調製したcDNAについて、S4-RNaseのcDNAに特異的なプライマー、S4-1、S-05でPCRを行うと、S4-RNaseのcDNAに相当するDNAフラグメントは二十世紀に比べ、極わずかしか増幅されない (Fig.23) (27)。これらの事実から、おさ二十世紀の花柱ではS4-RNaseが発現していないために和合性を示すと推測される。その原因として、プロモーターの変異によって発現できない、S4-RNaseの構造遺伝子自体が欠損している、などの理由が考えられる。それらを明らかにするために、おさ二十世紀のゲノムについてゲノミックサザン分析、PCR分析を行った。また、S4sm遺伝子型について確実な結果を得るためにおさ二十世紀の後代266-14 (S4sm S4sm) のゲノムのPCR分析も行った。

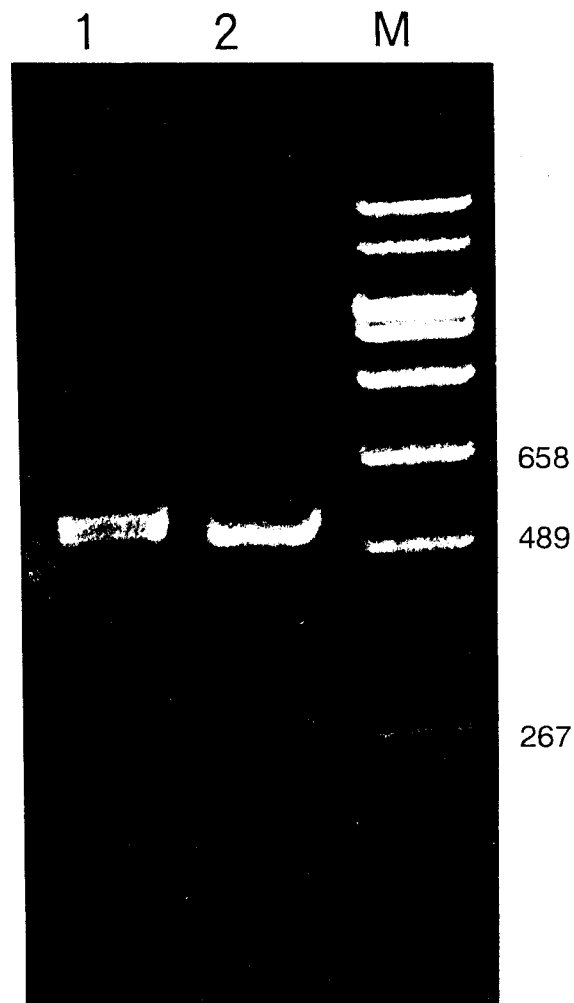


Fig.23 二十世紀、おさ二十世紀の花柱cDNAのPCR分析

レーン 1 : 二十世紀花柱cDNA
レーン 2 : おさ二十世紀花柱cDNA
M : マーカー

実験材料と実験方法

実験材料

二十世紀、おさ二十世紀white bud期の花柱は、第二章で述べた通り、採集し、液体窒素下で保存しておいたものを、おさ二十世紀の後代266-14 ($S_4^{sm}S_4^{sm}$) の花柱はつくば果樹試験場で1994年に採集し同じく液体窒素下で保存しておいたものを用いた。Hybond Nと α - ^{32}P -dCTPはAmershamから、LA PCRTMキットは宝酒造から購入した。

ゲノミックサザン分析

第四章で述べた方法で二十世紀、おさ二十世紀white bud期の花柱よりゲノムを調製し、同じ条件で、ゲノミックサザン分析を行った。

PCR分析

二十世紀、おさ二十世紀のゲノムについて、プライマーS01とS02、S4-1とS-05でPCRを行った。条件は次の通りである。

反応溶液 50 μ l (0.1 μ g ゲノムDNA、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2mM dNTP混合液、2.5U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ、15pmol プライマー)

反応条件

94°C	2分	} 25サイクル
94°C	40秒	
48°C	1分	
70°C	2分	
70°C	10分	

PCR反応はHYBAIDTM Thermal Reactor (Hook & Tucker Instruments)を用いて行った。

二十世紀、おさ二十世紀、おさ二十世紀の後代266-14 ($S_4^{sm}S_4^{sm}$)のゲノムについて、新たに合成したプライマーS4G-1とS4G-2でPCRを行った。これらのプライマーはS4-RNaseゲノム遺伝子を含む5kb *Eco*RIフラグメントのほぼ全長を増幅させるように設定した。プライマーの塩基配列、PCRの条件は以下の通りである。

S4G-1 5'-GCGAGACGTGGGTTGTCGGG-3'

S4G-2 5'-ACCCACTCGCCACTGTGTCC-3'

反応溶液 50 μ l (0.1 μ g ゲノムDNA、1xLA PCRTM buffer II、2.5mM MgCl₂、
0.4mM dNTP混合液、2.5U LA Taq DNAポリメラーゼ、15pmol
プライマー)

反応条件

95°C	1分	}	30サイクル
98°C	20秒		
62°C	5分		
72°C	10分		

PCR反応はPerkin ElmerのGene Amp PCR System 2400を用いて行なった。

結果

ゲノミックサザン分析

二十世紀、おさ二十世紀のゲノミックサザン分析の結果、*S2-RNase*のcDNAをプローブとした場合は、*EcoRI*、*EcoRV*、*BamHI*、*HindIII*消化物については両者とも同じ位置にポジティブバンドが得られた (Fig.24-a)。 *PstI*消化物ではおさ二十世紀にはポジティブバンドが得られなかったが、これはナイロンメンブレンへのトランスファーがうまくいかなかったためと考えられる。 *S4-RNase*のcDNAをプローブとした場合は、おさ二十世紀には二十世紀で見られるようなはっきりしたポジティブバンドは得られなかったが、二十世紀のバンドと同じ位置にかすかなバンドが見られた (Fig.24-b)。

PCR分析

二十世紀、おさ二十世紀のゲノムについて、*S2-RNase*、*S4-RNase*双方の遺伝子を増幅させるプライマーS-01とS-02を用いてPCRを行ったところ、*S2-RNase*遺伝子に相当するDNAフラグメントはどちらからも増幅された。しかし、*S4-RNase*遺伝子に相当するDNAフラグメントは二十世紀ゲノムからは*S2-RNase*遺伝子と同程度増幅されたが、おさ二十世紀ゲノムからはわずかしか増幅されなかった (Fig.25-a)。 *S4-RNase*遺伝子の特異的に増幅させるプライマーS4-1とS-05を用いてPCRを行うと、二十世紀からは相当するDNAフラグメントが増幅されたが、おさ二十世紀からはわずかしか増幅されなかった (Fig.25-a,b)。おさ二十世紀の後代266-14 (*S4sm S4sm*) ゲノム0.2μg、1.0μgについても同様にプライマーS4-1とS-05でPCRを行ったところ、DNAフラグメントは全く増幅されなかった (Fig.25-b)。

一方、得られた約5kbの*S4-RNase*ゲノム遺伝子を含むDNA全長を増幅させるプライマーS4G-1とS4G-2を用いて、二十世紀 (*S2S4*)、おさ二十世紀 (*S2S4sm*)、おさ二十世紀後代266-14 (*S4sm S4sm*)、長十郎 (*S2S3*)、幸水 (*S4S5*) のゲノムについてPCRを行なうと、二十世紀と幸水のゲノムのみ、はっきりした増幅DNAフラグメントが検出できた (Fig.26-a)。このフラグメントが、求める*S4-RNase*ゲノム遺伝子を含むDNAなら

ば、内部に*Eco*RIサイトが一箇所あるはずである。そこで、これらのDNAフラグメントを精製し*Eco*RIで消化したところ、どちらからも、約3kb、1.5kbの2つのDNAフラグメントが得られ (Fig.26-b)、求めるDNAフラグメントが増幅されたことが確認された。相当するDNAフラグメントはおさ二十世紀後代の266-14および長十郎からはまったく増幅されず、おさ二十世紀ではわずかに認められたにすぎない。

a) S₂-RNase

E	V	B	H	P					
N	O	N	O	N	O	N	O	N	O

b) S₄-RNase

E	V	B	H	P					
N	O	N	O	N	O	N	O	N	O

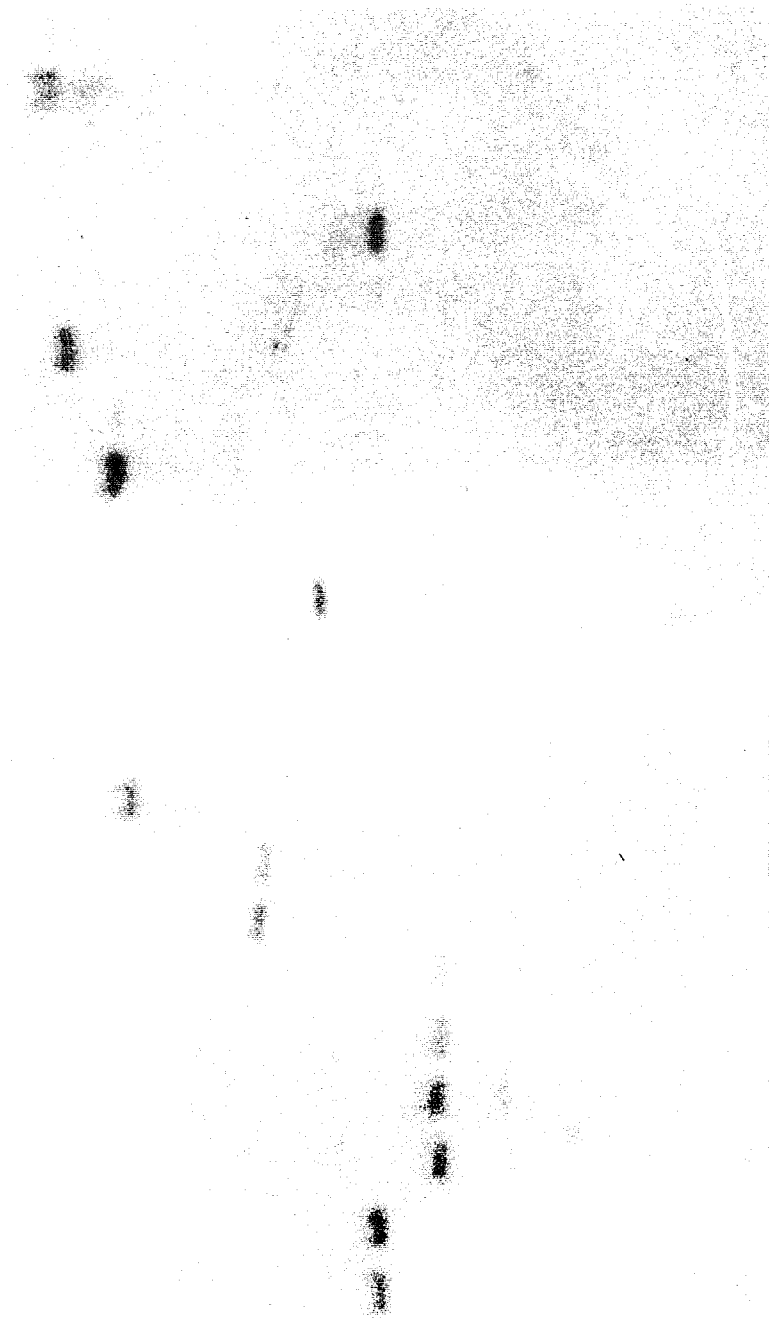


Fig.24 二十世紀、おさ二十世紀のゲノミックサザン分析

N : 二十世紀 O : おさ二十世紀
 E : *EcoRI* V : *EcoRV* B : *BamHI* H : *HindIII* P : *PstI*

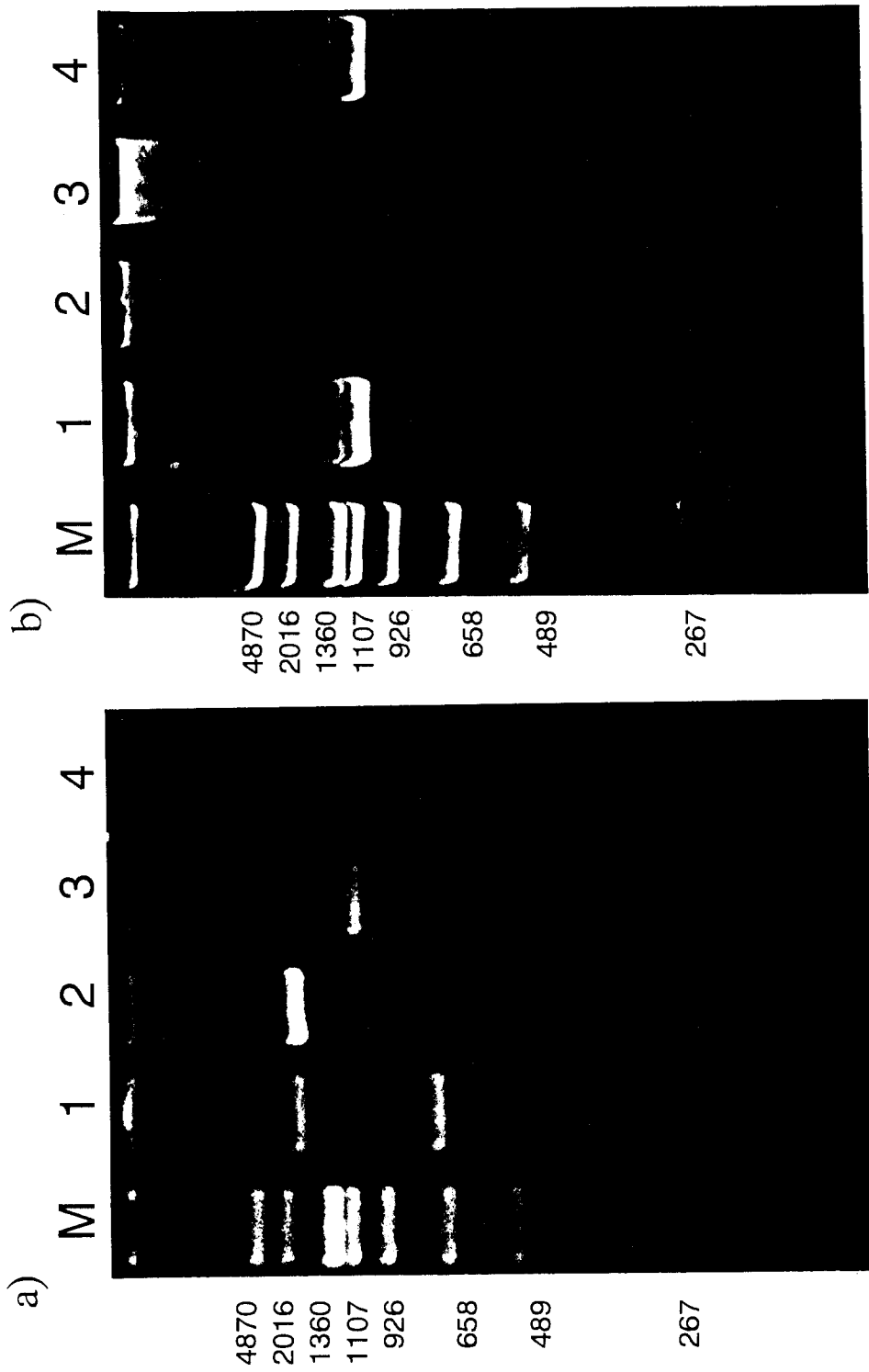


Fig.25 二十世紀、おさ二十世紀、おさ二十世紀後代(266-14)ゲノムのPCR分析

- a) M : マーカー
 レーン1 : 二十世紀ゲノム、プライマー S-01、S-02
 レーン2 : おさ二十世紀ゲノム、プライマー S-01、S-02
 レーン3 : 二十世紀ゲノム、プライマー S4-1、S-05
 レーン4 : おさ二十世紀ゲノム、プライマー S4-1、S-05
- b) プライマー S4-1、S-05
 M : マーカー
 レーン1 : 二十世紀ゲノム
 レーン2 : おさ二十世紀後代ゲノム (0.2μg)
 レーン3 : おさ二十世紀後代ゲノム (1μg)
 レーン4 : おさ二十世紀ゲノム

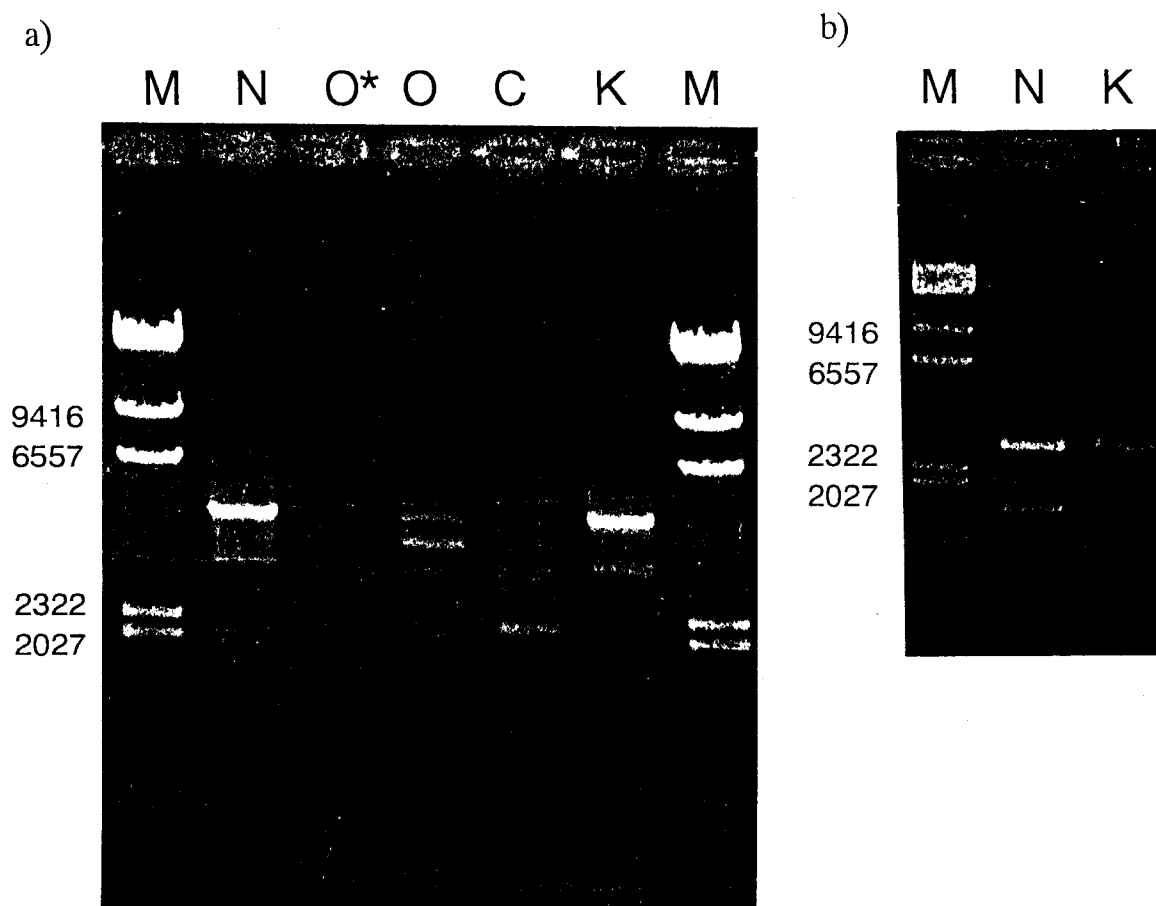


Fig.26 ニホンナシ栽培品種ゲノムのPCR分析

a) 栽培品種ゲノムのPCR産物、プライマーS4G-1、S4G-2

b) 二十世紀、幸水のPCR産物のEcoRI消化物

N : 二十世紀 (S_2S_4) O* : おさ二十世紀後代(266-14) ($S_4^{sm}S_4^{sm}$)

O : おさ二十世紀 ($S_2S_4^{sm}$) C : 長十郎 (S_2S_3) K : 幸水 (S_4S_5)

考察

花柱蛋白質の分析およびcDNAのクローニングにおいて、おさ二十世紀からはS4-RNaseは蛋白質もcDNAも得られず、この和合性品種ではS4-RNaseが発現されていないことが強く示唆された。おさ二十世紀の花柱cDNAのPCR分析では、S4-RNaseのcDNAに相当するDNAフラグメントがわずかに増幅され、プロモーター部分の変異によって発現が抑制されている可能性が考えられたが、ゲノミックサザン分析の結果、S4-RNaseの構造遺伝子自体が欠損している可能性が高くなった。しかし、ゲノミックサザン分析でも、二十世紀に比べて非常にわずかではあるが、S4-RNase遺伝子由来と思われるポジティブバンドが検出されており、さらにゲノムのPCR分析でもS4-RNase遺伝子に相当するDNAフラグメントがわずかに増幅されることもあり、この段階でその構造遺伝子の欠損について最終的な結論を出すことを避けた。一方、おさ二十世紀が二十世紀の枝変わりであるという事実から、おさ二十世紀には二十世紀の細胞が混在している可能性も否定できず、ゲノミックサザン分析、PCR分析で得られるポジティブシグナルはおさ二十世紀細胞からではなく、わずかに混在している二十世紀の細胞由来のものではないかとも考えられた。そこで、これらの曖昧さを排除するためにおさ二十世紀の自殖後代266-14のゲノムについて分析を行うことにした。266-14はS4smのホモ接合体(S4smS4sm)で、自家和合性である。この品種について得られる結果は純粋なS4sm-RNase遺伝子に関する信頼できる情報である。S4-RNaseのcDNA特異的プライマー、S4-1とS-05、S4-RNaseのゲノムに特異的なプライマー、S4G-1とS4G-2を用いたPCR分析の結果、おさ二十世紀後代266-14ゲノムからはS4-RNase遺伝子に相当するDNAフラグメントは全く増幅されず、S4smはS4-RNase構造遺伝子の欠損による変異であることが明らかとなった。すなわち、おさ二十世紀の和合性の原因はS4-RNase構造遺伝子の欠損によるものと結論した。欠損領域については、ゲノミックサザンでS4-RNaseのcDNAをプローブとした場合はっきりしたポジティブシグナルが得られなかったことから、その大部分が欠損していると思われる。また、S4G-1とS4G-2をプライマーとしたLongPCRの結果、相当する約5kbのDNAフラグメントも増幅されなかったことより、少なくとも、構造遺伝子から

5'-側1.5kb、または3'-側2.5kbが欠損しているものと思われる。

この欠損領域を確定するためにはさらなる解析が必要であるが、S4-RNase遺伝子の5'-側上流、または3'-側下流をプローブとしてゲノミックサザンを行ったところ、全体にスメアとなり解析ができなかった(佐々ら、未発表)。タバコ、ペチュニアで見い出されているように、ニホンナシでもS-RNase遺伝子の近傍には反復配列が多数存在し、このようなゲノミックサザン分析を困難としているのであろう。S4-RNase遺伝子より5'-側上流、または3'-側下流のDNAフラグメントを増幅させるようにプライマーを設定してPCRを行う、今回解析したよりさらに外側のゲノムのシーケンスをインバースPCRを行なって解析し、その塩基配列をもとに新たなプライマーを合成してLongPCRを行うなどの方法で欠損領域が明らかになるものと思われる。

第五章 総合考察

自家不和合性は、植物が近親交配を避け、様々な環境に適応できるような遺伝的な多様性を保持するために進化の過程で獲得してきた性質である。これは雌しべ側の細胞と花粉との間の自他認識反応であるが、自己を排除して他者を受け入れる点で、動物の免疫反応とは異なった植物独自の遺伝的機構であるといえる。自家不和合性は被子植物に広く分布し、71科250属以上の植物に存在するといわれている(1)。そのうち同型花型自家不和合性はほとんどが一遺伝子座の複対立遺伝子(S遺伝子)によって支配されており、花粉におけるS遺伝子の発現様式によって配偶体型と胞子体型に分類されている。

胞子体型自家不和合性についてはアブラナ科植物で研究がすすんでおり、雌しべ側の因子として柱頭で発現しているS-glycoprotein (SLG) とS-receptor kinase (SRK) が同定され(2)、プロテインキナーゼを介するシグナル伝達系の関与を示唆するデータが集積されつつある(69)。ところが、同じ胞子体型自家不和合性を示すにもかかわらず、ヒルガオ科のサツマイモ野生種では、柱頭で発現しているSRKと相同性の高いプロテインキナーゼ遺伝子はS遺伝子座と連鎖しておらず(70)、アブラナ科植物とは異なった機構が働いているものと思われる。

配偶体型自家不和合性についてはナス科植物で研究がすすんでおり、雌しべ側の因子として花柱特異的に発現しているT2型のリボヌクレアーゼ、S-RNaseが同定されている。自家不和合性の発現にはS-RNaseの存在が不可欠であり、しかも活性なRNaseが必須であることが、トランスジェニック植物や変異体植物の解析から明らかとなっている。すなわち、ペチュニアのS₃-RNaseのアンチセンス遺伝子を導入したS₂S₃個体では花柱でのS₃-RNaseの発現が抑制されて自家和合性となり、センス配列のS₃-RNase遺伝子を導入したS₁S₂個体では花柱で新たにS₃-RNaseが発現されてS₃花粉に対して不和合となった(12)。タバコでも、自家和合性の雑種にSA₂-RNase遺伝子を導入して得られたトランスジェニック植物がSA₂に対して不和合になることが示された(13)。また、タバコでは和合性種の雌しべのRNase活性は不和合性種に比べ100分の1以下であり(8)、トマト野生種で見つかった自家和合性の突然変異体では、花柱で発現しているS-RNaseに相当する蛋白質が活性部位のHisがAsnに変異しているた

めにRNase活性が消失し、そのために和合性になったと推定された(14、15)。

S-RNaseがどのように花粉側に認識され、どのような機構で花粉管の伸長を阻害するのかについてはまだ不明であるが、タバコで、自家受粉の場合のみ花粉管内のrRNAが分解されることが観察され、花柱に存在するS-RNaseが自己花粉の花粉管内に選択的に取り込まれ、rRNAを分解するために花粉管の伸長を阻害するという仮説が提出されている(16、17)。

S-RNaseと同じように、RNase活性が機能の発現に必要な例として、血管新生の誘導物質であるアンギオゲニンが知られている。アンギオゲニンは血清中に存在する14kdの蛋白質でRNaseAと33%の相同性があり、分子上に細胞表面のレセプターと結合する領域とRNaseの活性発現に必要な領域があると考えられている(71)。細胞内に取り込まれたアンギオゲニンは核へ輸送され、そこでRNase活性を介して血管新生の誘導物質としての機能をはたすと考えられるが、その機構についてはまだわかっていない。

一方同じく配偶体型自家不和合性をしめすケシ科ヒナゲシではS遺伝子座に連鎖している雌しべ側の因子として、柱頭から22kDa、等電点が7.4-8.6の糖蛋白質が検出された(19)。ケシ科のS遺伝子産物はRNaseではないと予測されていたが(18)、この蛋白質が単離され、cDNAがクローニングされたところ、アミノ酸120残基からなる蛋白質で、他の自家不和合性種において単離されている蛋白質とは全く相同性がなかった(42)。また、不和合反応における花粉管の伸長阻害には Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして関与していると考えられているが(72)、実際、不和合反応において花粉管で特異的にリン酸化される蛋白質が同定され(73)、花粉管の伸長阻害にイノシトール3リン酸を介するシグナル伝達系が関与していることがわかってきた(74)。他の配偶体型不和合性植物については花粉側の因子についてはまだほとんど情報が得られていないが、ケシ科では唯一花粉側の因子について明らかになりつつある。

私が研究対象に選んだバラ科のニホンナシの場合は、その花柱にRNase活性が見い出されたことより、ナス科植物と同様にS-RNaseが不和合性に関与していると予想されていた。しかし、和合性突然変異種おさ二十世紀花柱にもRNase活性が存在していたことから、RNase活性と自家不和合性との関連性についての詳細な検討が必要と

なった。花柱蛋白質の分析結果より、二十世紀、おさ二十世紀どちらの花柱にも *S* 遺伝子座とは連鎖していない高活性型の *non-S-RNase* が存在しており、花柱で検出された *RNase* 活性はこの *non-S-RNase* の寄与によるものであることが示された (22)。一方、二十世紀花柱では低活性型の2つの *S-RNase*、*S2-RNase*、*S4-RNase* が蛋白質、*cDNA* とともに検出されたが、おさ二十世紀花柱では *S4-RNase* の発現が疑問視されており、*S4-RNase* の発現が抑制されているために自家不和合性となったと推測されていた (27)。今回、おさ二十世紀、おさ二十世紀後代のゲノムを分析した結果、おさ二十世紀は *S4-RNase* 遺伝子がゲノム上で欠損しており、*S4-RNase* が発現していないために自家不和合性となったことが明らかとなった。すなわち、*S-RNase* 遺伝子の欠損が自家不和合性をひきおこすという直接的な証明によって、バラ科植物の自家不和合性にもナス科植物同様 *S-RNase* が関与していることが示されたのである。

自家不和合性は被子植物界に広く分布しており、単子葉植物よりも双子葉植物に多く認められる。双子葉植物について、進化系統樹上で自家不和合性植物の分布を調べてみると (Fig.27)、進化の過程において、配偶体型自家不和合性から孢子体型自家不和合性が分化し、さらに異形花型自家不和合性に分化したと考えられる。しかし、配偶体型のナス科と孢子体型のアブラナ科ではその機構が全く異なっていることより、それぞれが独立に自家不和合性を獲得してきたと考えられる。また、同じ孢子体型、または配偶体型自家不和合性を示す植物でも、アブラナ科とヒルガオ科、ナス科とケシ科のように、科によってその機構は異なっている。自家不和合性の出現を植物の進化と関連づけて考える上で、他科植物の不和合性機構について調べることは非常に重要なことである。私たちが対象としたバラ科は進化的には配偶体型自家不和合性を示すナス科とケシ科の間にあり、その自家不和合性に *S-RNase* が関与しているという結果は、これら3つの科の植物がそれぞれの配偶体型自家不和合性の機構をいつ獲得したのかを推測する上で大きな知見を与えた。ケシ科は進化系統樹上ではバラ科、ナス科とは別の分枝上にあり、おそらく、分化した後で独自の自家不和合性機構を獲得したものと思われる。ナス科とバラ科はともに *S-RNase* が関与する自家不和合性の機構を持つが、進化的に見れば、バラ科からナス科が分化しており、自家不和合性の機構もそのまま受け継がれてきたと考えられる。あるいは、バラ科とナス科が分化した後、おのおのが独自に *S-RNase* を介する自家不和合性の機

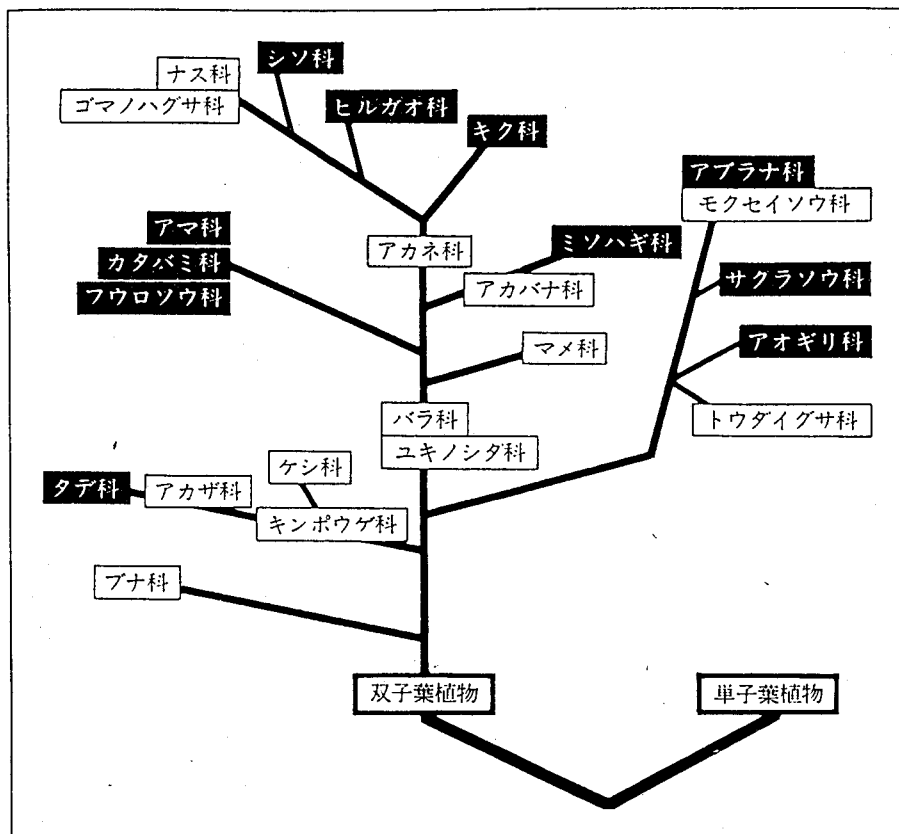


Fig.27 進化系統樹における自家不和合性植物の分布

黒字の反転文字は孢子体型自家不和合性植物を、それ以外は配偶体型自家不和合性植物を示す。異型花型自家不和合性植物は孢子体型として示してある。

(神山康夫 化学と生物 32、567-576 (1994))

構を獲得したとも考えられるが、その基となったT2型RNaseはバラ科、ナス科の分化以前には既に獲得されていたと思われる。

T2型RNaseは、S-RNaseが見つかって以来、植物にも広く存在することがわかってきた。生理的な役割がはっきりしているのは自家不和合性に関わっているS-RNaseだけだが、トマトの培養細胞、シロイヌナズナ、タバコのS-like RNaseなどはリン酸の欠乏によって誘導されており、植物のT2型RNaseはリン酸の代謝に関係しているのかもしれない。そういう点で、ケシ科の自家不和合性で花粉側の応答反応にCa²⁺—イノシトール3リン酸を介するシグナル伝達系が関与していることは興味深い。自家不和合性は花粉管の発芽、伸長を阻害することで起こる。花粉管の発芽や伸長の機構はどの植物でもあまりかわらず、おそらくは花粉管の発芽や伸長のためのシグナルはどの植物でも同じ様な経路で末端の酵素へ伝わっていると考えられる。そのシグナル伝達系がどこかで阻害されることで自家不和合性反応が起こるとするならば、今わかっている自家不和合性の雌しべ側の因子(S-RNase、ケシ科で見つかっている蛋白質、SLG、SRKなど)はそれぞれ全く異なった種類の蛋白質であるが、その役割は同じで、花粉管発芽、伸長へ至るシグナル伝達系の阻害ということができるだろう。その意味で、ケシ科で明らかとなりつつある花粉側の情報が他の自家不和合性の機構にも新たな知見を与えるかもしれない。

ナス科、バラ科の配偶体型自家不和合性の機構については、雌しべ側の因子がS-RNaseとして同定されたところであり、S-RNaseがどのようにしてS遺伝子型特異的に花粉(管)側に認識されるか、その後どのような機構で花粉管伸長が阻害されるかなどはまだ明らかにはなっていない。現在、S-RNaseを認識する花粉側の因子についての探索が自家不和合性研究者の間で始まっており、自家不和合性の機構の解明に向けて、その結果が待たれている。

参考文献

- (1) de Nettancourt, D. (1977) "Incompatibility in Angiosperms" Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- (2) Hinata, K., Watanabe, M., Toriyama, K. and Isogai, A. (1993) A review of recent studies on homomorphic self-incompatibility. *Inter.Rev.Cytol.* **143**, 257-296
- (3) Sims, T.L. (1993) Genetic regulation of self-incompatibility. *Crit.Rev.Plant Sci.* **12**, 129-167
- (4) Franklin, F.C.H., Lawrence, M.J. and Franklin-Tong, V.E. (1995) Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int.Rev.Cytol.* **158**, 1-64
- (5) Nasrallah, J.B. and Nasrallah, M.E. (1993) Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**, 1325-1335
- (6) Dickinson, F.G., Crabbe, M.J.C. and Graude, T. (1992) Sporophytic self-incompatibility systems: *S* gene products. *Inter.Rev.Cytol.* **140**, 525-561
- (7) Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F. and Kyogoku, Y. (1990) Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur.J.Biochem.* **176**, 683-697
- (8) McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F. and Clarke A.E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957
- (9) Newbigin, E., Anderson, M.A. and Clarke, A.E. (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**, 1315-1324
- (10) Singh, A. and Kao, T.-h. (1992) Gametophytic self-incompatibility: Biological, molecular genetics, and evolutionary aspects. *Int.Rev.Cytol.* **140**, 449-483
- (11) Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G. and Coen, E.S. (1996) Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* *S* locus RNases. *Plant Cell* **8**, 805-814
- (12) Lee, H.S., Huang, S. and Kao, T.-h. (1994) *S* proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**, 560-563
- (13) Murfett, J., Atherton, T.L., Mou, B., Gasser, C.S. and McClure, B.A. (1994) *S*-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes *S*-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563-

- (14) Kowiyama, Y., Kunz, C., Lewis, I., Newbigin, E., Clarke, A.E. and Anderson, M.A. (1994) Self-compatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. *Theor.Appl.Genet.* **88**, 859-864
- (15) Royo, J., Kunz, C., Kowiyama, Y., Anderson, M., Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1994) Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 6511-6514
- (16) McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A. and Clarke, A.E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**, 955-957
- (17) Gray, J.E., McClure, B.A., Bonig, I., Anderson M.A. and Clarke, A.E. (1991) Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on *in vitro*-grown pollen tubes. *Plant Cell* **3**, 271-283
- (18) Franklin-Tong, V.E., Atwal, K.K., Howell, E.C., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.H.(1991) Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L.: there is no evidence for the involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant Cell Environ.* **14**, 423-429
- (19) Franklin-Tong, V.E., Ruuth, E., Marmey, P., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.H. (1989) Characterization of a stigmatic component from *Papaver rhoeas* L. which exhibits the specific activity of a self-incompatibility (S-) gene product. *New Phytol.* **112**, 307-315
- (20) 古田収、今井敏彦、三好武満、矢積延雄、植木昭一、林真二、平木志都夫 (1980) '日本ナシ' および'二十世紀' の特性 園芸学会大会研究発表要旨 (秋季大会) 70-71
- (21) Sato, Y. (1993) Breeding of self-compatible Japanese pear. In *Techniques on Gene Diagnosis and Breeding in Fruit Trees* (Hayashi, T. *et al* , eds.), pp.241-247, FTRS/Japan, Tokyo
- (22) 小根山千歳 修士論文 (平成7年2月)
- (23) Ishimizu, T., Sato, T., Saito, Y., Yoshimura, Y., Norioka, S., Nakanishi, T. and Sakiyama, F. (1996) Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese Pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J.Biochem.* **120**, 326-334

- (24) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1980) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction *Anal.Biochem.* **162**, 156-159
- (25) Qian, M. and Wilkinson, M. (1991) DNA Fragment Purification: Removal of Agarose 10 minutes after Electrophoresis *Biotechniques* **10**, 736-738
- (26) 大西佳美 修士論文 (平成7年2月)
- (27) Norioka, N., Norioka, S., Ohnishi, Y., Ishimizu, T., Oneyama, C., Nakanishi, T. and Sakiyama, F. (1996) Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J.Biochem.* **120**, 335-345
- (28) Lutcke H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. and Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**, 43-48
- (29) Janssens, G.A., Goderis, I.J., Broekaert, W.F. and Broothaerts, W. (1995) A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor.Appl.Genet.* **91**, 691-698
- (30) Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T. and Ikehashi H. (1996) Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encodes members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol.Gen.Genet.* **250**, 547-557
- (31) Tautz, D. and Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* **12**, 4127-4138
- (32) Nordheim, A. and Rich, A. (1983) The sequence (dC-dA)_n • (dG-dT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**, 1821-1825
- (33) Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T., Seidman, M. and Stollaar, B.D.(1984) Characterization of genomic poly(dT-dG) • poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. *Mol.Cell.Biol.* **4**, 2610-2621
- (34) Slightom, J.L., Blechl, A.E. and Smithies, O. (1980) Human fetal G_γ-and A_γ-globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell* **21**, 627-638
- (35) Wahls, W.P., Wallace, L.J. and Moore, P.D. (1990) The Z-DNA motif d(TG)₃₀

- promotes receipt of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. *Mol.Cell.Biol.* **10**, 785-793
- (36) Hamada, H., Seidman, M., Howard, B.H. and Gorman, C.M. (1990) Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) · poly(dC-dA) sequence. *Mol.Cell.Biol.* **4**, 2622-2630
- (37) Naylor, L.H. and Clark, E.M. (1990) d(TG)_n · d(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene form D-DNA and inhibit gene transcription. *Nucl.Acids Res.* **18**, 1595-1601
- (38) Stallings, R.L., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hilderbrand, C.E. and Moyzis, R.K. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* **10**, 807-815
- (39) Lagercrantz, U., Ellegren, H. and Andersson, L.(1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl.Acids.Res.* **21**, 1111-1115
- (40) Bell, C.J. and Ecker, J.R. (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144
- (41) Ishimizu, T., Norioka, S., Kanai, M., Clarke, A.E. and Sakiyama, F. (1996) Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur.J.Biochem.* **242**, 627-635
- (42) Foote, H.C.C., Ride, J.P., Franklin-Tong, V.E., Walker, E.A., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.H. (1994) Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 2265-2269
- (43) Karunanandaa, B., Huang, S. and Kao, T.-h. (1994) Carbohydrate moiety of the *petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell* **6**, 1933-1940
- (44) Woodward, J.R., Craik, D., Dell, A., Khoo, K.-H., Munro, S.L.A., Clarke, A.E. and Bacic, A. (1992) Structural analysis of the N-linked glycan chains from a stelar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Glycobiology* **2**, 241-250
- (45) Kurihara, H., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M., Mizuno, H. and Nakamura, K. (1992) Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *FEBS Letters* **306**, 189-192

- (46) Dodds, P.N., Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1996) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol.Biol.* **31**, 227-238
- (47) Kuroda, S., Norioka, S., Mita, M., Kato, I. and Sakiyama, F. (1995) Primary structure of a novel stylar RNase unassociated with self-incompatibility in a tobacco plant, *Nicotiana glauca*. In *Methods in protein structure analysis* (Atassi, M.Z. and Appella, E., eds) pp.429-433, Plenum Press, New York
- (48) Lee, H.-S., Singh, A. and Kao, T.-h. (1992) RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanaceous S proteins. *Plant Mol.Biol.* **20**, 1131-1141
- (49) Jost, W., Bak, H., Glund, K., Terpstra, P. and Beintema, J.J. (1991) Amino acid sequence of an extracellular phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur.J.Biochem.* **198**, 1-6
- (50) Kock, M., Löffler, A., Abel, S. and Glund, K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of phosphate-starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol.Biol.* **27**, 477-485
- (51) Löffler, A., Glund, K. and Irie, M. (1993) Amino acid sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur.J.Biochem.* **214**, 627-633
- (52) Taylor, C.B., Bariola, P.A., delCardayre, S.B., Raines, R.T. and Green, P.J. (1993) RNS2: a senescence-associated RNase gene of *Arabidopsis thaliana* that diverged from the S-RNase before speciation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 5118-5122
- (53) Taylor, C.B. and Green, P.J. (1991) Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **96**, 980-984
- (54) Ide, H., Kimura, M., Arai, M., and Funatsu, G. (1991) The complete amino acid sequence of ribonuclease from seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *FEBS Lett.* **284**, 161-164
- (55) Rojo, M.A., Arias, F.J., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Munoz, R., Escarmis, C., Soriano, F., Lopez-Fando, J., Mendez, E. and Girbes, T. (1994) Cusativin, a new cytidine-

- specific ribonuclease accumulated in seeds of *Cucumis sativus* L. *Planta* **194**, 328-338
- (56) Xu, B., Grun, P., Kheyr-Pour, A. and Kao, T.-h. (1990) Identification of pistil-specific proteins associated with three self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense*. *Sex.Plant Reprod.* **3**, 54-60
- (57) Hiratsuka, S., Hirata, N., Tezuka, T and Yamamoto, Y. (1985) Self-incompatibility reaction of Japanese pear in Various stages of floral development. *J.Jpn.Soc.Hort.Sci.* **54**, 9-14
- (58) Nakanishi, T.M., Sacki, N., Maeno, M., Ozaki, T., Kawai, Y. and Ichii, T. (1991) Ultrastructure study on the stylar transmitting tissue in Japanese pear. *Sex.Plant Repr.* **4**, 95-103
- (59) Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA *Nucleic Acids Research*, **8**, 4321-4325
- (60) 渡辺格・監修、杉浦昌弘・編集 植物バイオテクノロジー実験マニュアル クローニングとシーケンス
- (61) 松本亨 修士論文 (平成9年2月)
- (62) Goodall, G.J. and Filipowicz, W. (1989) The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell* **58**, 473-483
- (63) Hanley, B.A. and Schuler M.A. (1988) Plant intron sequences: evidence for distinct groups of introns. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7159-7176
- (64) Broothaert, W., Janssens, G.A., Proost, P. and Broekaert, W.F. (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol.Biol.* **27**, 499-511
- (65) Matton, D.P., Mau, S.-L., Okamoto, S., Clarke, A.E. and Newbigin, E. (1995) The *S*-locus of *Nicotiana glauca*: genomic organization and sequence analysis of two *S*-RNase alleles. *Plant Mol.Biol.* **28**, 847-858
- (66) Coleman, C.E. and Kao, T.-h. (1992) The flanking regions of two *Petunia inflata* *S* alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. *Plant Mol. Biol.* **18**, 725-737
- (67) Chung, I.K., Lee, S.Y., Ito, T., Tanaka, H., Nam, H.G. and Takagi, M. (1995) The 5' flanking sequences of two *S* alleles in *Lycopersicon peruvianum* are highly heterologous but

- contain short blocks of homologous sequences. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1621-1627
- (68) Kaufmann, H., Salamini, F. and Thompson, R.D. (1991) Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. *Mol.Gen.Genet.* **226**, 457-466
- (69) Nasrallah, J.B., Rundle, S.J. and Nasrallah, M.E. (1994) Genetic Evidence for the requirement of the Brassica S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *Plant J.* **5**, 373-384
- (70) Kowayama, Y., Kakeda, K., Kondo, K., Imada, T. and Hattori, T. (1995) A putative receptor protein kinase gene from *Ipomea trifida*. *Plant Cell Physiol.* **37**, 681-685
- (71) Moroianu, J. and Riordan, J.F. (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 1677-1681
- (72) Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P., Read, N.D., Trewavas, A.J. and Franklin, F.C.H. (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.* **4**, 163-177
- (73) Rudd, J.J., Franklin, F.C.H., Lord, J.M. and Franklin-Tong, V.E. (1996) Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* **8**, 713-724
- (74) Franklin-Tong, V.E., Drobak, B.K., Allan, A.C., Watkins, P.A.C. and Trewavas, A.J. (1996) Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell* **8**, 1305-1321

謝辞

本研究を遂行するにあたり、このような興味深い研究に携わる機会と終始にわたる適切な御助言と御指導を賜りました大阪大学蛋白研究所崎山文夫教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、数々の御助言、御指導を賜りました同研究所乗岡茂巳助教授に深く感謝致します。また、様々な面から支援して下さった同研究室の李紹良助手、八木芳子教務員、吉村由美技官、笹井千鶴嬢に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、蛋白質側の数多くのデータを提供して下さった博士課程2年の石水毅君、おさ二十世紀のcDNAクローニングを担当して下さった大西佳美さんをはじめ、あらゆる面で協力して下さった同研究室の学生の方々に感謝致します。

また、貴重な実験材料を提供して下さった鳥取県園芸試験場、つくば果樹試験場の皆様、RNaseRhの立体構造のモデリングをして下さった国立遺伝研究所の西川建博士に感謝いたします。

最後に、常に私を支え、励ましてくれた家族に心から感謝いたします。