

所属 (主指導教 官)	バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座 (磯貝 彰 教授)		
氏名	村瀬 浩司	提出	平成 16年 1月 8日
題目	アブラナ科植物の自家不和合性におけるシグナル伝達機構の解析		

要旨

多くの被子植物は自家不和合性と呼ばれる自己の花粉を認識、拒絶し、他家受精を進める分子機構を持っている。アブラナ科植物の自家不和合性は S と呼ばれる 1 遺伝子座の複対立遺伝子 (S 遺伝子) によって支配され、花粉と柱頭が同じ S 遺伝子を変現型として持つとき、花粉の発芽や花粉管伸長が抑制される。これまでに S 遺伝子座の柱頭側決定因子である SRK (S receptor kinase) および花粉側決定因子 $SP11$ (S locus protein 11) が同定され、花粉から放出されたリガンドである $SP11$ が柱頭の膜貫通型レセプターキナーゼである SRK と S 遺伝子型特異的に結合し、 SRK をリン酸化させることが明らかとなっている。この S 遺伝子型特異的な SRK の活性化が花粉拒絶反応を引き起こしていると考えられているが、そのシグナル伝達経路や花粉拒絶反応の分子機構はほとんど未解明のままである。

Brassica rapa var. Yellow Sarson は自家和合性の変異株で、 S 遺伝子および M (*modifier*) 遺伝子に変異を持つとされている。本株の持つ m 変異は劣性の変異であり、 mm 遺伝子型の株は S 遺伝子が正常でも柱頭側の不和合性が打破されるため、 M 遺伝子産物は SRK の下流で重要な働きをしていると考えられてきた。1997 年に米国コーネル大学のグループより M 遺伝子はアクアポリン様遺伝子 MOD をコードしていると報告されたが、その後に反証が成され、 M 遺伝子の本体は未だに明らかになっていない。本研究は、アブラナ科植物の自家不和合性におけるシグナル伝達機構の解明を目指し、 M 遺伝子の実体を明らかにすること目的とした。

まず、 M 遺伝子のポジショナルクローニングを行うために、Yellow Sarson $S_{f_2}S_{f_2}mm$ の和合性原因遺伝子の内、 m 遺伝子のみを野生株 *B. rapa* S_8S_8MM に交配により導入することを試みた。両者間の F_2 後代の不和合、和合の分離比を解析したところ、予想に反し、Yellow Sarson は S および M 遺伝子以外にも和合の原因となる変異を含む可能性が示唆された。さらに詳細な交配実験を通じ、不和合性関連遺伝子の座乗する S 、 M 、および $ARCI$ 遺伝子座とは連鎖していない 1 遺伝子座上の変異の存在を確認した。新たに見いだされた遺伝子座上の変異については本研究ではさらに追求しなかったが、Yellow Sarson が従来示唆されてきた 2 遺伝子変異ではなく、少なくとも 3 つの遺伝子に変異を持つ自家和合株であることが明らかとなった。

次に、*M* 遺伝子のポジショナルクローニングを行うために、*M* 遺伝子座近傍の AFLP マーカーを作製し、これらを基に遺伝地図を作製した。*M* 遺伝子座は AFLP マーカー A23 と A40 の間、0.8 cM の領域にマップされた。一方、*MOD* は *M* 遺伝子座とは 1.65 cM 離れていることが確認され、*M* 遺伝子本体でないことが明らかとなった。次に AFLP マーカー A23 と A40 を起点に染色体歩行を行い、0.8 cM の領域について約 500 kbp の BAC クローンによる物理地図を作製した。2,157 染色体の組み換え解析の結果、BAC251-22 上に *M* 遺伝子座があることが明らかとなった。そこで、BAC251-22 の 103 kbp の塩基配列を決定し、最終的に約 50 kbp の領域まで *M* 遺伝子座を絞り込んだ。

この領域には 12 の予測 ORF が存在したが、その内の 1 つが情報伝達に関わるプロテインキナーゼをコードしていると推定されたので、*M locus protein kinase* (*MLPK*) と命名し、さらに詳細な解析を行った。*MLPK* の mRNA は柱頭で特異的に検出され、柱頭の不和合性獲得時期と合致した発現パターンを示した。*m* 変異体の *MLPK* は、キナーゼドメイン VIa 内の 1 塩基置換により保存された 194 番目のグリシンがアルギニンに変わっており、その変異型 *MLPK* の発現タンパク質はキナーゼ活性を欠くことが示された。また、*m* 変異体において、*MLPK* の mRNA の発現は認められたが、ウエスタンブロット解析では *MLPK* タンパク質は検出されなかった。いずれの結果も *m* 変異体では *MLPK* が機能していないことを示している。*MLPK* が *M* 遺伝子の本体であることを確かめるため、一過的に柱頭に遺伝子を発現させる試験法を確立した。*m* 変異体の柱頭にパーティクルガンを用いて *RFP* と *MLPK* のコンストラクトを撃ち込み、*RFP* の発現した細胞に花粉をのせたところ、コントロールの *RFP* のみを発現させた細胞では自家花粉を受け入れたが、*RFP* と共に *MLPK* を発現させると自家花粉を拒絶した。この結果は *MLPK* が *m* 変異を相補するのに十分であることを示している。以上の結果から、*M* 遺伝子の本体は *MLPK* であると結論づけた。

MLPK は 404 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端からミリストイル化モチーフ、セリンリッチドメイン、キナーゼドメイン、C 末端の機能未知ドメインによって構成されている。また、*MLPK* はレセプターキナーゼと進化的に近縁であるが細胞外ドメインを持たない receptor like cytoplasmic kinase (RLCK) ファミリーの一員である。*MLPK* の細胞内での局在を調べるために GFP 融合タンパク質としてタバコ BY-2 細胞で発現させたところ、*MLPK* は細胞膜に局在した。また柱頭抽出物の生化学的分画によっても *MLPK* の細胞膜画分への濃縮が確認され、*MLPK* が膜アンカー型タンパク質であることが示唆された。

本研究では *M* 遺伝子のポジショナルクローニングによって膜アンカー型プロテインキナーゼである *MLPK* がアブラナ科植物の自家不和合性シグナル伝達に重要な因子であることを明らかにした。本結果は RLCK ファミリーの一員である *MLPK* が植物のレセプターキナーゼを介するシグナル伝達に関わっていることを示す初めてのものである。

アブラナ科植物の自家不和合性反応におけるシグナル伝達機構の解析

村瀬 浩司

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座

(磯貝 彰 教授)

平成 16 年 1 月 8 日

目次

序章	3
第1章 自家和合性 <i>Brassica rapa</i> var. Yellow Sarson の遺伝学的解析	12
序	12
材料と方法	12
結果	17
考察	27
第2章 <i>M</i> 遺伝子のポジショナルクローニング	29
序	29
材料と方法	29
結果	36
考察	47
第3章 <i>MLPK</i> の生化学的、分子生物学的解析	52
序	52
材料と方法	52
結果	55
考察	65
総括	75
謝辞	76
参考文献	77

序章

多くの高等生物は性を持ち、組みかえによる遺伝子のシャッフリングと受精による他個体の遺伝子の導入により、常に新しい遺伝的バックグラウンドを持った子孫を残すことによって集団の遺伝的多様性や持続した進化を維持し、生存競争に勝ち残ってきた。顕花植物の多くは1つの花に雄しべと雌しべを持つ両性花で自家受精しやすい性質を持つ。そのため、それらの植物は他家受精が有利になるシステムを進化させてきた。自家不和合性は自己の花粉を拒絶することによって他家受精を進める性質を示し、25万種ある被子植物の半数以上がそのようなシステムを持っているといわれている。典型的な自家不和合性は S とよばれる1つの複対立遺伝子(S_1, S_2, \dots, S_n)によって支配され、柱頭と花粉が同じ S 遺伝子を変現型として持つとき、その花粉は拒絶される(図1)。自家不和合性は花粉拒絶の遺伝的な制御の違いから雌しべの持つ S 遺伝子と花粉の変現型が持つ S 遺伝子が一致したときに花粉の拒絶が起こる配偶体型と雌しべと花粉親が変現型として持つ S 遺伝子が一致したときに起こる孢子体型に大別される。配偶体型自家不和合性を持つ植物にはケシ科、ナス科、バラ科、ゴマノハグサ科などがあり、孢子体型自家不和合性にはアブラナ科、キク科、ヒルガオ科などがある。ナス科、バラ科、ゴマノハグサ科では雌しべ側の S 遺伝子産物は同じ遺伝子であるが、ケシ科およびアブラナ科の雌しべ側の S 遺伝子産物はそれぞれ異なる遺伝子をコードしていることから、これら3種の自家不和合性は別々に進化したものであると考えられている(McCubbin and Kao, 2000)。

アブラナ科植物は1遺伝子座支配の孢子体型自家不和合性を持ち、花粉の認識は柱頭表面を覆う乳頭細胞と呼ばれるクチクラ層で覆われた突起状の細胞によって行われている。和合花粉が乳頭細胞につくと乳頭細胞から吸水を始め、数分から数時間で発芽し、花粉管を細胞壁に進入させ、伸長していく。一方、不和合花粉が柱頭についた場合、多くの花粉は吸水、発芽が阻害され、また花粉管が伸長したときでも、乳頭細胞に進入できなくなる(図2)。自家不和合性は S 遺伝子によって支配されているため、アブラナ科植物の自家不和合性の研究もまず S 遺伝子産物の同定を目的に行われた。はじめに発見された S 遺伝子産物はSLG(S locus glycoprotein)であり、異なる S 遺伝子をもつ柱頭タンパク質の解析から、 S 遺伝子特異的な等電点を持つ糖タンパク質として見つかった(Nishio and Hinata, 1977)。SLGは約50 kDaの分泌型糖タンパク質で(Takayama *et al.*, 1987; Nasrallah *et al.*, 1987)、柱頭の乳頭細胞の細胞壁に豊富に蓄積している(Kandasamy *et al.*, 1989; Kishi-Nishizawa *et al.*, 1990)。柱頭側のもう一つの S 遺伝子産物として膜貫通型レセプターキナーゼをコードするSRK(S locus receptor kinase)がある(Stein *et al.*, 1991)。SRKは約120 kDaのタンパク質であり、細胞外にSLGと高い相同性を持つSドメイン、一つの膜貫通ドメイン

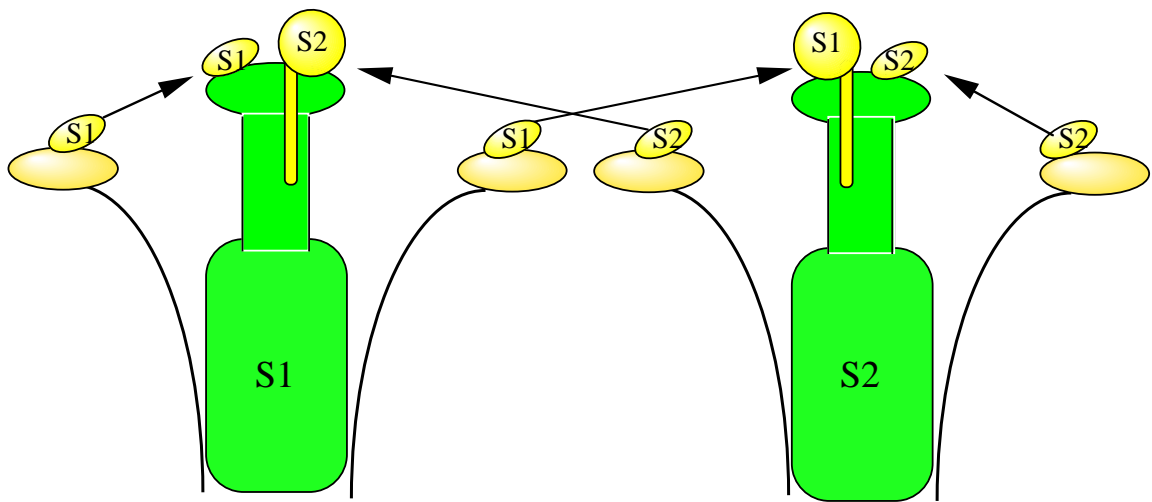
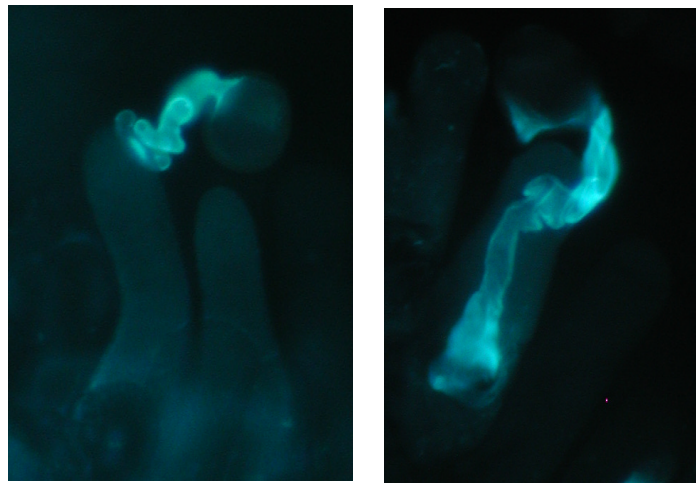


図1 被子植物の自家不和合性



不和合受粉

和合受粉

図2 *B. rapa*柱頭の乳頭細胞における不和合花粉の拒絶。アニリンブルー染色により花粉管のカロースが染色されている。

をへて、細胞内のキナーゼドメインとつながっている。形質転換実験により、この二つの柱頭側の *S* 遺伝子産物のうち、SRK が *S* 遺伝子型を決定するのに十分であることが明らかとされ、また、SLG は *S* 遺伝子型の決定に必要ではないが、SLG を導入すると不和合性が強くなることから、SLG は何らかの形で関与していると推定されている (Takasaki *et al.*, 2000)。

花粉側の *S* 遺伝子産物としては *SP11* (*S locus protein 11* または *SCR*, *S locus cysteine rich*) が同定されている (Suzuki *et al.*, 1999; Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000)。SP11 は葯のタペート組織と花粉で発現しており、8つのシステインをもつ小さな分泌型タンパク質 (6~8 kDa) をコードしている。形質転換実験および合成タンパク質を用いた試験により、*SP11* が花粉の *S* 遺伝子型を決定することが示された (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 2001)。SP11 は *in vitro* において同じ *S* 遺伝子型の SRK と特異的に結合し (Takayama *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001) SRK の自己リン酸化を誘導する (Takayama *et al.*, 2001)。これらの *S* 遺伝子産物の解析から、花粉に含まれるリガンドである SP11 が受粉時に柱頭側のレセプターキナーゼである SRK と *S* 遺伝子特異的に結合し、SRK のキナーゼドメインを活性化することによって、下流のターゲットタンパク質をリン酸化し、花粉拒絶反応を引き起こしていると考えられている (図 3A)。

タンパク質のリン酸化が植物の情報伝達においても重要な役割を果たしていることはモデル植物である *Arabidopsis* において 860 のプロテインキナーゼが存在し、全遺伝子の約 3% を占めることからわかる (The Arabidopsis Genom Initiative, 2000)。プロテインキナーゼスーパーファミリーのキナーゼドメインの相同性を元にした系統分類から、*Arabidopsis* のレセプターキナーゼは 610 のメンバーが共通の祖先を持つ大きな 1 つのファミリーを形成していることが明らかになっている (Shiu and Bleecker, 2001)。レセプターキナーゼは植物ホルモンの反応、細胞の分化と増殖、植物の成長と発達、自家不和合性、病原菌および共生菌の認識などに重要な働きをしている (Torii, 2000; Takayama and Sakagami, 2002; Morris and Walker, 2003; Dievart and Clark, 2003)。このように多くのレセプターキナーゼの機能が明らかになってきたのに対してそれらのリガンドや下流の因子が決定された例はまだ少数である。植物のレセプターキナーゼシグナル伝達は BRI1 (Brassinosteroid-Insensitive 1)、CLV1 (CLAVATA1)、SRK、FLS2 (FRAGELLIN INSENSITIVE 2) の 4 つのレセプターキナーゼにおいて先駆的な研究がなされてきた。

BRI1 は細胞外にロイシンリッチリピートを持つレセプターキナーゼで、植物ホルモンであるブラシノステロイド (BR) を過剰に与えた時に根の伸長阻害が起こらない BR 非感受性変異体から発見された (Li and Chory, 1997)。BRI1 は同じくロイシンリッチリピート型のレセプターキナーゼである BAK1 (BRI1-Associated receptor Kinase

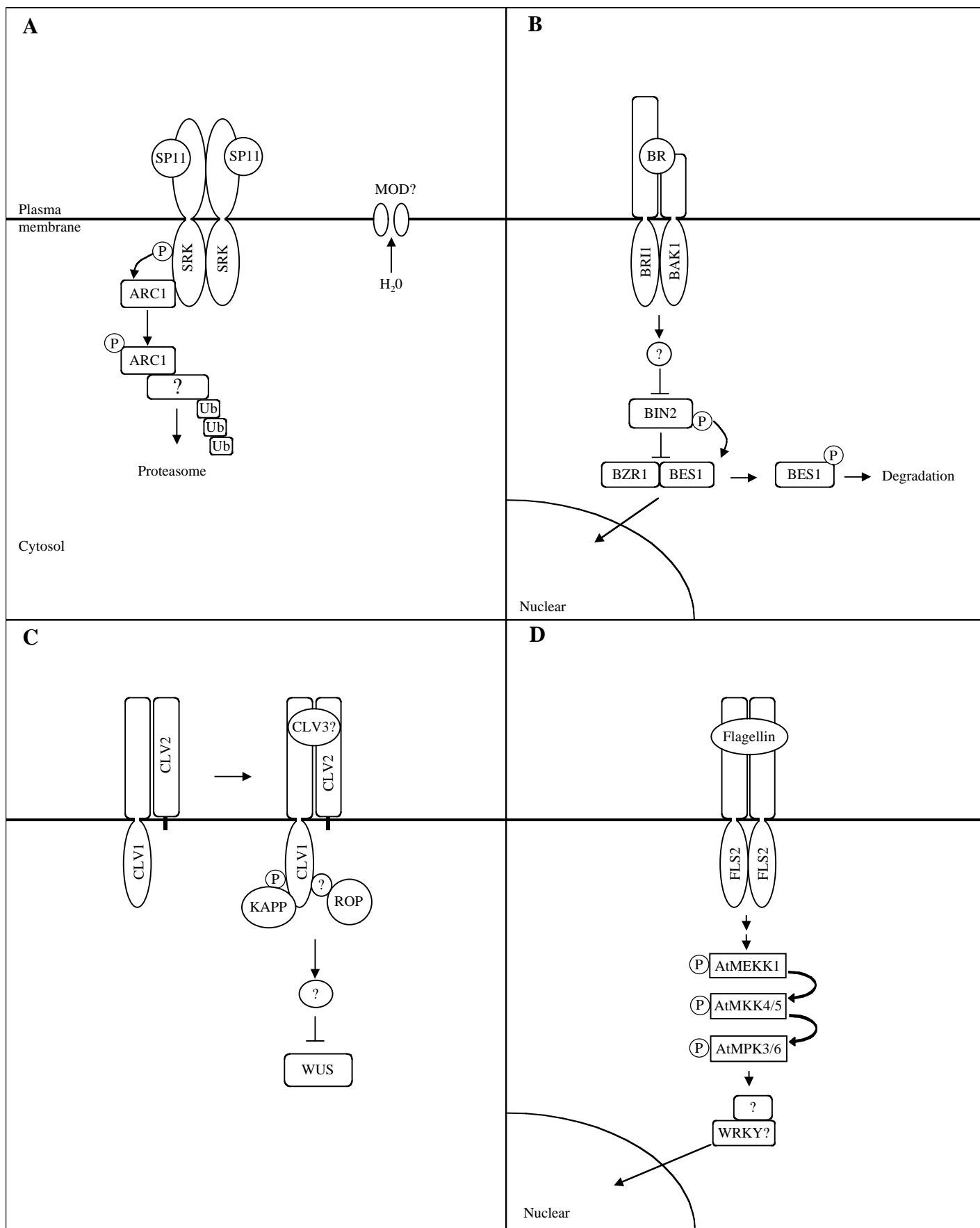


図3 植物のレセプターキナーゼシグナル伝達のモデル。A、アブラナ科植物の自家不和合性シグナル伝達。B、ブラシノステロイドシグナル伝達。Yinらの図を改変 (Yin et al., 2002)。C、CLVシグナル伝達。Clarkの図を改変 (Clarck, 2001)。D、フラジェリンシグナル伝達。Asaiらの図を改変 (Asai et al., 2002)。

1) とヘテロダイマーを形成し BR を認識していると考えられている (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002) (図 3B)。GSK3/SHAGGY ファミリーのプロテインキナーゼである BIN2 (Brassinosteroid-Insensitive 2) は BRI1 と同様に BR 非感受性の変異体からクローニングされ、gain of function 変異体であったことから BR の負の制御因子であることが示されている (Li and Nam, 2002)。動物細胞においては GSK3/SHAGGY ファミリーのプロテインキナーゼ GSK3 は常時活性型でターゲットタンパク質をリン酸化することによって分解しているが、上流から Wnt シグナルが伝わると不活性化し、ターゲットタンパク質が蓄積することによってシグナルが伝わるということが知られている (Cohen and Frame, 2001)。BIN2 の場合も同様であり、サプレッションスクリーニングにより BIN2 のターゲットタンパク質である BES1 (BRI1-EMS-Suppressor 1) および BZR1 (Brassinazole Resistant 1) が得られている (Yin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002)。BES1、BZR1 は互いに 88% の相同性を持つタンパク質で、核移行シグナル、GSK3 のリン酸化モチーフ、PEST ドメインを持つ (Yin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002)。BES1、BZR1 は two-hybrid system で BIN2 と相互作用が見られること、*in vitro* で BIN2 によってリン酸化されること、*in vivo* において BR の添加によってリン酸化されなくなり、核に蓄積することから、BRI1 を介した BR のシグナルは BIN2 を不活性化し、分解を受けなくなった BES1、BZR1 が核へと移行して BR のターゲット遺伝子の発現を誘導すると考えられている (He *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002)。

Arabidopsis の *CLAVATA* 遺伝子の変異は茎頂分裂組織で未分化の細胞の増殖が起こし、周辺の細胞の分化が阻害される (Clark, 2001)。*CLAVATA* 遺伝子座は *CLV1*、*CLV2*、*CLV3* の 3 つが存在し、*CLV1* はロイシンリッチリピート型のレセプターキナーゼ、*CLV2* は細胞内ドメインの欠いた *CLV1* 様のタンパク質をコードしており、レセプターとして機能していると予想されている (Clark *et al.*, 1993, 1995, 1997; Kayes and Clark, 1998; Jeong *et al.*, 1999) (図 3C)。*CLV3* は分泌型の小さなタンパク質をコードしており、*CLV1* のリガンドであると考えられている (Flechter *et al.*, 1999)。*In vivo* において *CLV1* は 185 kDa と 450 kDa の複合体を形成し、185 kDa の複合体は *CLV1* と *CLV2* のヘテロダイマーと予想され、450 kDa の複合体は 185 kDa の複合体に加えて、プロテインフォスファターゼである KAPP (kinase-associated protein phosphatase) および低分子量 GTPase Rop (Rho GTPase-related protein) を含んでいると報告されている (Trotochaud *et al.*, 1999)。*clv3* 変異株においては 450 kDa の複合体は見られないため、不活性型の 185 kDa の *CLV1* レセプター複合体がリガンドである *CLV3* と結合すると 450 kDa の活性型レセプター複合体となり、シグナルを伝えていると予想されている (Trotochaud *et al.*, 1999)。KAPP はロイシンリッチリピート型レセプターキナーゼである HAESA (RLK5) のキナーゼドメインと相互作用するホスファターゼとしてクローニングされ、*CLV1*、*FLS2* などのレセプターキナーゼとも相互作用し、これら

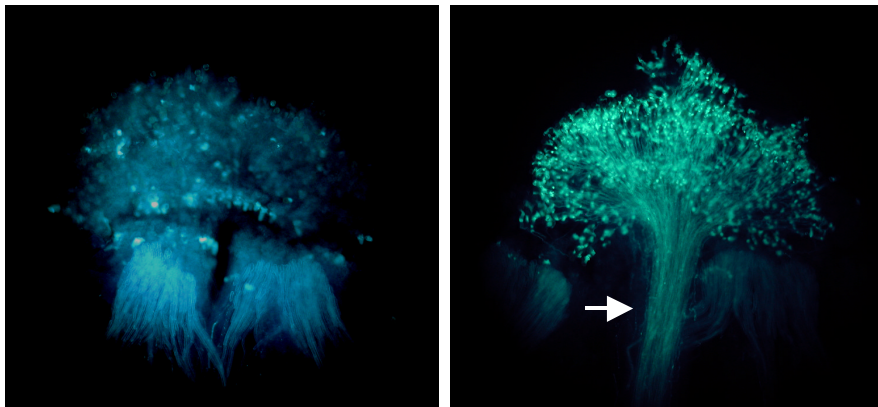
のレセプターキナーゼを脱リン酸化することによって負の調節をしていると考えられている (Stone *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1997; Gómez-Gómez *et al.*, 2001)。 CLV シグナル伝達の下流の候補としてホメオドメインを含み転写因子であると考えられている WUSCHEL (WUS) がある。 WUS は茎頂の未分化細胞の維持に重要な役割を果たしており、 CLV シグナルによって WUS の発現が抑えられると CLV3 の発現も抑制される (Clark, 2001; Schoof *et al.*, 2000)。 この WUS と CLV3 のフィードバックループにより、茎頂での未分化細胞の数が調節されていると考えられている (Clark, 2001; Schoof *et al.*, 2000)。

Arabidopsis は病原菌 *Pseudomonas syringae* の鞭毛タンパク質フラジェリンを認識し、抵抗反応を起こす。 *Arabidopsis* のフラジェリンの認識には 22 アミノ酸残基からなるペプチド断片 (Flg22) で十分であり、 Flg22 に非感受性の変異株の解析からクローニングされた *FLS2* はロイシンリッチリピートをもつレセプターキナーゼをコードしており、フラジェリンのレセプターとして働いていると考えられている (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Gómez-Gómez and Boller, 2000) (図 3D)。 Flg22 処理によって MAPKKK である MEKK1、MAPKK である MKK4/5、MAP kinase である MPK3/6 が活性化されることが示されている (Asai *et al.*, 2002)。 また、 Flg22 によって誘導される遺伝子のプロモーターが転写因子 WRKY の結合モチーフを持ち、 WRKY22/29 を発現させることによってプロモーター活性が上昇するため、 WRKY が下流のターゲットタンパク質であることが示唆されている (Asai *et al.*, 2002)。 これらのレセプターキナーゼシグナル伝達のモデルとなっているレセプターはその直接のターゲットは発見されていないが、他のいくつかのレセプターキナーゼではキナーゼドメインを用いた two-hybrid スクリーニングによってターゲットの候補が見いだされている (Skirpan *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Llompарт *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2003)。

自家不和合性シグナル伝達においては SRK のキナーゼドメインを用いた酵母の two-hybrid screening により、 SRK のキナーゼドメインと結合する 3 つのタンパク質が同定された。 そのうちの二つはジスルフィド結合を還元する酵素であるチオレドキシシン H をコードする THL1 および THL2 であり (Bower *et al.*, 1996) THL1 は *in vitro* において SP11 の非存在下で SRK の自己リン酸化を阻害すると報告されているが (Cabrillac *et al.*, 2001) それを否定する報告もされている (Takayama *et al.*, 2001)。 3 つ目のタンパク質は ARC1 であり、 ARC1 は 7 つのアームリピート構造を持ち、 *in vitro* で SRK のキナーゼドメインによってリン酸化されることから、 SRK の直接のターゲット分子であると予想され、 アンチセンスを用いた形質転換実験により、 ARC1 は SRK シグナルのポジティブエフェクターであることが示された (Gu *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1999)。 後に ARC1 は N 末端に E3 コピキチンリガーゼ活性を持つとされる U box を持つことが明らかにされ、 ARC1 は *in vitro* において E3 活性を持つこと、

不和合受粉時に柱頭でユビキチン化タンパク質が増加し、ARC1 のアンチセンス形質転換体では減少していること、プロテアソーム阻害剤によって不和合が弱くなることから、ARC1 は柱頭の何らかのタンパク質をユビキチン化して分解し、その結果、花粉の拒絶が起こると予想されている (Azevedo *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2003) (図 3A)。また最近になって SRK のキナーゼドメインに結合するタンパク質としてカルシウムのセンサータンパク質であるカルモジュリンと膜タンパク質の輸送に関わるタンパク質である SNX1 (sorting nexin) が同定された (Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。動物のレセプターキナーゼである EGF シグナル伝達においてはカルモジュリンと SNX1 はレセプターキナーゼの負の制御因子であり (San José *et al.*, 1992; Kurten *et al.*, 1996) SRK シグナル伝達においても同様の働きをしていると予想されている (Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。KAPP は SRK とも two-hybrid および *in vitro* の結合実験で相互作用が観察され、*in vitro* において SRK を脱リン酸化するため、他のレセプターキナーゼで観察されるように SRK シグナル伝達を負に制御していると考えられている (Vanoosthuyse *et al.*, 2003)。SRK のキナーゼドメインを用いた two-hybrid スクリーニングによって得られた SRK に相互作用するタンパク質のうち、自家不和合性シグナルを正に伝えていることが示されたのは ARC1 のみで、残りは負の制御因子であると予想されている。また、ARC1 のアンチセンス形質転換体は完全に自家不和合性が打破されておらず、この原因は *ARC1* mRNA の抑制が十分でないか、他のシグナル伝達経路があることが示唆されており、自家不和合性シグナル伝達の十分な解明には至っていない (Stone *et al.*, 1999)。

上述したように植物レセプターキナーゼのシグナル伝達機構の解明には変異体を用いた遺伝学的解析が主流であり、シグナル伝達に関わる分子の大半がこのアプローチによってクローニングされてきた。一方、アブラナ科の自家不和合性シグナル伝達の研究ではゲノムやマーカーの情報ほとんどないこと、花が咲くまで表現型が観察できないこと、植物体のサイズやライフスパンが遺伝学的解析には不向きであること、自家受粉はすべて手作業で行わなければならないため変異体の作出は困難であることなどから、このようなアプローチはほとんどされてこなかった。*Brassica rapa* var. Yellow Sarson はインド原産の自家和合性栽培種であり、遺伝学的な解析により、*S* 遺伝子および *S* 遺伝子座とは連鎖しない遺伝子の変異により自家和合性になっていることが示され、*modifier (m)* 遺伝子と命名された (Hinata *et al.*, 1983) (図 4)。*m* 遺伝子は劣性の変異であり、*SRK* に対して上位であること、不和合が完全に打破されることから、*SRK* の下流で働く重要な因子であると予想されてきた (Hinata *et al.*, 1983)。1997 年、コーネル大学のグループより *m* 遺伝子の本体が水チャネルタンパク質をコードするアクアポリン様遺伝子、*MOD* であると *Science* 誌に報告された (Ikeda *et al.*, 1997)。彼らは、野生株 (*S₈S₈MODMOD*) と Yellow Sarson C634



野生型 (S_8S_8MM) 自家受粉 m 変異体 (S_8S_8mm) 自家受粉

図4 m 変異体の柱頭の表現型。矢印は花粉管を示している。

($S_{12}S_{12}modmod$) 株を掛け合わせた F_2 植物を用いたディファレンスディスプレイ法によりスクリーニングされた MOD 遺伝子が m 変異体において非常に減少していることを見出した (Ikeda *et al.*, 1997)。 MOD 遺伝子は F_2 260 個体および $MODmod$ を自家受粉した F_3 114 個体ですべて連鎖すること、 $modmod$ 個体において mRNA の発現が減少していること、ガンマ線照射によって M 遺伝子座を欠失させた独立した 8 株の変異体が自家和合性になったというデータを元に M 遺伝子の本体が MOD であると結論した (Ikeda *et al.*, 1997)。しかしながら、 MOD を用いた相補試験が行われていないこと、ガンマ線照射による変異株の欠失領域についての詳細な解析がされていないことから、 M 遺伝子の本体が MOD 遺伝子座周辺の遺伝子である可能性が否定できなかった。

本論文では自家不和合性の分子機構を明らかにするために M 遺伝子の解析を行った。まず MOD が本当に M 遺伝子であるかを検証するために *B. rapa* 野生株と Yellow Sarson を交配し、その後代の解析と AFLP マーカーを用いた M 遺伝子座の遺伝地図の作製を行い、 MOD は M 遺伝子座とは連鎖しているが、 M 遺伝子本体ではないことを明らかにした。これと平行してフランスのグループから *B. oleracea* の MOD ホモログ (MOD のオソログも含む) は花粉の認識部位である柱頭の乳頭細胞では発現していないことが *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織学的手法によって示された (Marin-Olivier *et al.*, 2000)。また東北大学のグループからも自家不和合性の *B. rapa* cv. Waseokabu の MOD mRNA が Yellow Sarson と同じ程度の発現量しかないこと、 M 遺伝子座を欠失させたガンマ線変異株で MOD は欠失していないにもかかわらず自家和合性になったものが存在することが明らかにされ (Fukai *et al.*, 2001)、 MOD は M 遺伝子本体ではないことが他の研究グループのデータからも裏付けられた。

次に本当の M 遺伝子をクローニングするために BAC (bacterial artificial chromosome) クローンによる M 遺伝子座周辺の物理地図を作製し、 M 遺伝子のある BAC クローンを特定した。BAC クローンの塩基配列の解析から M 遺伝子は 12 の候補遺伝子に絞られ、そのうちの 1 つがプロテインキナーゼをコードしており、MLPK (*M locus protein kinase*) と命名した。MLPK は柱頭で特異的に発現する膜アンカー型のプロテインキナーゼであり、 m 変異体においてはその機能を失っていた。MLPK が M 遺伝子の本体であることを確かめるために新たに生物試験法を確立し、MLPK が m 変異を相補できること確認した。最後にこれらの結果を基に MLPK が自家不和合性シグナル伝達のポジティブエフェクターとして働くモデルを提唱する。

第 1 章 自家和合性 *Brassica rapa* var. Yellow Sarson の遺伝学的解析

序

B. rapa var. Yellow Sarson は自家和合性で、自家不和合株との雑種後代を用いた解析から、*S* 遺伝子座とは独立に遺伝し、自家和合性をもたらす遺伝子が発見され、*M* (modifier) と命名された (Hinata *et al.*, 1983)。Yellow Sarson のもつ *m* 遺伝子は劣性の変異であり、*mm* 株では正常な *S* 遺伝子があっても自家和合性になる (Hinata *et al.*, 1983)。Yellow Sarson は *S* 遺伝子座 (S_{f_2}) も機能を失っており、これまでの解析から、*SLG* は低いレベルで発現しているが、*SRK* の転写産物は検出できず、 $S_{f_2}S_{f_2}$ 株では *SRK* が発現していないことにより自家和合性になっていると考えられている (Nasrallah *et al.*, 1994)。*M* 遺伝子については序章で述べたように、コーネル大学のグループから *Arabidopsis* の *PI1B* と相同なアクアポリン遺伝子 *MOD* が *M* 遺伝子であると報告があったが、後に否定的な報告がされた (Ikeda *et al.*, 1997; Marin-Olivier *et al.*, 2000; Fukai *et al.*, 2001)。コーネル大学のグループの報告によると、自家不和合性株 S_8 系統 (S_8S_8MM) と Yellow Sarson C634 系統 ($S_{f_2}S_{f_2}mm$) を掛け合わせた F_2 260 個体の解析では自家不和合株と自家和合株の割合が 9 : 7 となり、そのうちの S_8S_8 株では自家不和合株と自家和合株が 3 : 1 となるため、*S* 遺伝子および *M* 遺伝子の 2 つの変異が自家和合性の原因だとしている (Ikeda *et al.*, 1997)。また *MOD/mod* の遺伝子型は F_2 の S_8S_8 株 79 個体、 $S_8S_{f_2}$ 株 79 個体および $S_8S_8Modmod$ 株を自家受粉して得られた F_3 114 個体の表現型と完全に一致していたとしている (Ikeda *et al.*, 1997)。そのため、*MOD* が *M* 遺伝子でないとしても、本当の *M* 遺伝子を探すための良いマーカーとなることが考えられた。これらのことをふまえ、真の *M* 遺伝子をクローニングすることを目的に *B. rapa* var. Yellow Sarson の遺伝学的解析を行った。

材料と方法

材料

特に記載のない化学薬品は和光純薬もしくはナカライテスクの製品を使用した。遺伝子工学用酵素は特に記載のない限り、Takara の製品を用いた。

自家不和合性 *Brassica rapa* S_8S_8 および S_9S_9 ホモ個体は日本の小国から採取され、解析されたものを用いた (Takayama *et al.*, 1987; Isogai *et al.*, 1987)。*B. rapa* Rapid Cycling 株はウィスコンシン大学 (Crucifer Genetics Cooperative) より入手した。Rapid Cycling バックグラウンドの S_8S_8 および S_9S_9 ホモ個体は S_8S_8 および S_9S_9 株をそれぞれ Rapid Cycling 株と交配し、 S_8S_8 は 5 世代、 S_9S_9 は 4 世代集団交配して安定した形質を示すものを選抜した (Shiba *et al.*, 未発表)。*B. rapa* cv. おそめは市販品 (タキイ種苗 (株)) であり、*S* 遺伝子型は $S_{52}S_{60}$ である (Takasaki *et al.*, 1997)。*B. rapa* var. Yellow Sarson

はインドで栽培されている自家和合性栽培種で日向康吉東北大学名誉教授よりいただいた。Yellow Sarson C634 株は機能不全の *S* 遺伝子座 S_{f_2} をもち、遺伝子型は $S_{f_2}S_{f_2}mm$ である (Hinata *et al.*, 1983; Nasrallah *et al.*, 1994)。

自家不和合性の検定

自家不和合性の検定はアニリンブルー染色により柱頭への花粉管の進入を観察することによって行った (Kho and Bear, 1968)。開花当日の柱頭に花粉を乗せた後、6 時間後の花柱をエタノール：酢酸 (3 : 1) 溶液に 2 時間固定し、1N の NaOH 溶液に入れ、60 分に 90 分間置いた。室温に戻し、染色液 [2% (w/v) アニリンブルー、2% (w/v) K_3PO_4] に 2.5 時間置いた後、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) によるマーカーの作製

M 遺伝子座周辺のマーカーの作製は AFLP によって行った。Michelmore *et al.*の方法に従い、 S_8S_8Mm (*MODmod*) を自家受粉して得られた個体から $S_8S_8MODMOD$ (*MOD* はアクアポリンの遺伝子型) と $S_8S_8modmod$ をそれぞれ 8 個体ずつ選抜し、GenElute™ Plant Genomic DNA Kit (SIGMA) を用いて各 100 mg の葉から DNA を抽出し、バルク化した (Michelmore *et al.*, 1991)。AFLP は Vos *et al.*の方法に従って行った (Vos *et al.*, 1995)。EcoRI アダプターは ECOA1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3') および ECOA2 (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') の 2 種類のプライマーをアニールさせて作製した。MseI アダプターは MSEA1 (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3') および MSEA2 (5'-TACTCAGGACTCAT-3') の 2 種類のプライマーをアニールさせて作製した。AFLP のテンプレート DNA は 0.5 μ g の DNA を酵素混合液 [1 \times T4 DNA Ligase buffer、50 mM NaCl、50 μ g/ml BSA、5 μ M MseI アダプター、0.5 μ M EcoRI アダプター、1 U/ μ l MseI (New England Biolabs)、5 U/ μ l EcoRI (New England Biolabs)、10 U/ μ l T4 DNA Ligase (Takara)] 11 μ l 中で 25°C、1 晩反応させた後、65°C に 20 分置き酵素を失活させ、TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA) 189 μ l を加えて作製した。AFLP プライマーは EcoRI アダプター側を 5'-XRITC (substituted rhodamine isothiocyanate) 化したプライマー (Takara) を用いた。EcoRI アダプター側のプライマーは次の 20 種である。E-1 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCAC-3'); E-2 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCACA-3'); E-3 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'); E-4 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCACC-3'); E-5 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'); E-6 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'); E-7 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'); E-8 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCACG-3'); E-9 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTCT-3'); E-10 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTCA-3'); E-11 (5'-XRITC-

GACTGCGTACCAATTCTAC-3'); E-12 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTCC-3'); E-13 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTGC-3'); E-14 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTAG-3'); E-15 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTGG-3'); E-16 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCTCG-3'); E-17 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCCAA-3'); E-18 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCCAT-3'); E-19 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCCAC-3'); E-20 (5'-XRITC-GACTGCGTACCAATTCCAG-3')。 *MseI* アダプター側のプライマーは次の 64 種である。 M-1 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'); M-2 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'); M-3 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'); M-4 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'); M-5 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'); M-6 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'); M-7 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAA-3'); M-8 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAC-3'); M-9 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAG-3'); M-10 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAT-3'); M-11 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTA-3'); M-12 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTC-3'); M-13 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAACA-3'); M-14 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAACC-3'); M-15 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAACG-3'); M-16 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAACT-3'); M-17 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATCA-3'); M-18 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATCC-3'); M-19 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'); M-20 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGC-3'); M-21 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'); M-22 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGT-3'); M-23 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATGA-3'); M-24 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATGC-3'); M-25 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATCG-3'); M-26 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATCT-3'); M-27 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'); M-28 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'); M-29 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTT-3'); M-30 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTG-3'); M-31 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATGT-3'); M-32 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATGG-3'); M-33 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'); M-34 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACCC-3'); M-35 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACCG-3'); M-36 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3'); M-37 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'); M-38 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACGC-3'); M-39 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACGG-3'); M-40 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3'); M-41 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCA-3'); M-42 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCC-3'); M-43 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCG-3'); M-44 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCT-3'); M-45 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGA-3'); M-46 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGC-3'); M-47 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGG-3'); M-48 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGT-3'); M-49 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAA-3'); M-50 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAC-3'); M-51 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'); M-52 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'); M-53 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAATA-3'); M-54 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAATC-3'); M-55 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAATG-3'); M-56

(5'-GATGAGTCCTGAGTAAATT-3'); M-57 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATAA-3'); M-58 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATAC-3'); M-59 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATAG-3'); M-60 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATAT-3'); M-61 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATTA-3'); M-62 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATTC-3'); M-63 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATTG-3'); M-64 (5'-GATGAGTCCTGAGTAATTT-3')。

AFLP の PCR は 2 段階で行った。1 度目の PCR は 20 μ l の反応液 (1 μ l DNA テンプレート、1 \times *Ex taq* buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M ECOA1 プライマー、0.5 μ M MSEA1 プライマー、0.05 U/ μ l *Ex taq*、Takara) を調整し、プレ PCR (94°C、5 分)、94°C を 5 分、56°C を 1 分、72°C を 1 分のサイクルを 20 回の条件で行った。10 μ l を電気泳動 (1% アガロースゲル) で流し、PCR 産物がスミアに見えることを確認した後、残りを 190 μ l の TE に溶かした。2 度目の PCR は *EcoRI* アダプター側のプライマー 20 種と *MseI* アダプター側の 64 種類を各々組み合わせた計 1280 通りの組み合わせで行った。PCR は 10 μ l の反応液 (0.5 μ l テンプレート、0.05 U/ μ l rTaq DNA polymerase (TOYOBO)、1 \times rTaq buffer、2.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.1 μ M XRITC 化 *EcoRI* アダプタープライマー、0.5 μ M *MseI* アダプタープライマー) で行い、反応条件はプレ PCR (94°C、2 分)、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルでアニール温度を 0.7 $^{\circ}$ C づつ下げていくタッチダウン PCR を 12 サイクル、94°C で 30 秒、56°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 23 サイクルとした。反応液および分子量マーカー (GENE SCAN-500 ROX、パーキンエルマー) は等量のローディングバッファー (95% ホルムアミド、10 mM EDTA、0.04% プロモフェノールブルー) と混合し、3 分間 94 $^{\circ}$ C でヒートショックを行った後、氷上で急冷した。サンプル (2 μ l) は 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。ポリアクリルアミドゲルは 50 ml の 4.75% アクリルアミド、0.25% N,N'-メチレンビスアクリルアミド、6.8 M 尿素、50 mM Tris-HCl、50 mM ホウ酸、1 mM EDTA 溶液をアスピレーターで 3 分間脱気した後、250 μ l の 10% 過硫酸アンモニウム、25 μ l の TEMED を混合し、42 \times 20 cm のガラス板 (Takara) に流し込んで作製した。泳動バッファーは TBE (100 mM Tris-HCl、100 mM ホウ酸、2 mM EDTA) を用い、1800 V で 2.5 時間泳動した。FMBIOII Multi View (Hitachi) を用いて泳動像の読みとり、解析を行った。

バルク化ゲノムを用いた一次スクリーニングで多型が検出されたプライマーペアについて、*MODMOD* 株を 4 個体、*modmod* 株を 4 個体の計 8 個体を用いた 2 次スクリーニングを行った。テンプレート DNA の調製と PCR 反応は同様にして行った。*M* 遺伝子座に強くリンクしている AFLP マーカーは pGEM-T Easy ベクター (Promega) にクローニングした。アクリルアミドゲルより目的のバンドを切り出し、ゲル断片を 300 μ l の TE 中でペッスルを用いて破碎した。ゲルの溶出液をテンプレートに対応する *EcoRI* および *MseI* アダプタープライマーを用いて PCR を行い、メ

ーカーのプロトコルに従ってクローニングした。インサートは M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') と M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') プライマーを用いて PCR で増幅し、PCR product pre-sequencing kit(USB)で処理した後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

遺伝マーカー

遺伝子型の解析は SSLP (simple sequence length polymorphism) もしくは CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーを作製して行った。S 遺伝子座のマーカーとして SLG の多型を利用した。MOD は第 1 イントロンの長さが異なるため SSLP マーカーとなる (Fukai *et al.*, 2001)。ARC1 はコード領域の塩基配列の違いから CAPS マーカーとなる。SLG はプライマー-SLG-1 (5'-AGAACACTTGTATCTCCCGGT-3') と SLG-R (5'-CATAGTCGGATCCGTGTTTT-3')、MOD は MODF (5'-ATTATCTTCCACCTTCAGCT-3') と MODR (5'-TTATCCAATCAAAGTTCGCG-3')、ARC1 は ARC1 (5'-AGTCCAAGTCTTCGCCGTCTTAC-3') と ARC4 (5'-AAAAGCTTACGCGTCAAGACC) を用いて PCR で増幅した。増幅した断片は SLG は *Bst*XI で、ARC1 は *Eco*81I で切断すると多型を観察することができる。S₆₀SLG は ClassIIF (5'-ATGAAAGGGGTACAGAACAT-3') および ClassIIR (5'-CTCAAGTCCCCTGCTGCGG-3') プライマーを用いて PCR 増幅させた。各 PCR 産物は 1% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色したのち UV イルミネーター (ATTO) で観察した。高密度マッピングのために AFLP マーカー-A15 の塩基配列を元に CAPS マーカーを作製した。A15 のフラグメントはプライマー-A15F (5'-AATTCAGGCAAGTTATGGCC-3') および A15R (5'-TAAAGTCGTACGTATTTCCA-3') を用いて PCR で増幅した後、*Pst*I で切断し、3% アガロースゲルで分離した。A23 および A40 はシーケンスマーカーで A23 はプライマー-A23F (5'-GAGGAAGAATCTGTGGTAAC-3') と A23R (5'-TAAGGTAAACCTTGTTTCGAT-3') を用いて PCR で増幅させ、A23F プライマーで塩基配列を決定した。A40 はプライマー-A40F (5'-AATTCTCAATTTCCAAGCCT-3') と A40R (5'-TAAGCGCGTCCGCAGCTAGC-3') で増幅させ、A40 プライマーで塩基配列を決定した。

マッピング

M 遺伝子座の低精度マッピングは AFLP を用いて行い、S₈S₈MODmod 遺伝子型の個体 2 株を自家受粉させて得た後代 MODMOD 株 24、MODmod 株 48、modmod 株 24

個体を選抜して用いた。AFLP の 2 次スクリーニングで用いた 8 個体と併せると、これらの個体の持つ 104 染色体が組みかえ率の計算の対象となりうる。そのうちの 100 染色体について採用した。遺伝距離は組みかえ率 r (%) を Kosambi の式に挿入して求めた (Kosambi, 1944)。

$$\text{遺伝距離 (cM)} = 25 \ln (100 + 2r/100 - 2r)$$

高精度マッピングは $S_8S_8MODmod$ を自家受粉させた後代 434 個体を用いた。各植物体について MOD と A15 マーカーの遺伝子型を解析した。 $MODmod$ 株では 1 染色体、 $modmod$ 株では 2 染色体について観察できる。計 485 染色体から、 MOD と A15 マーカー間で組みかわっている 39 個体を選抜し、自家不和合性/自家和合性の表現型の観察および AFLP 解析によりマッピングを行った。

変異株の作製

線照射は京都大学農学部助教授奥本裕博士の協力によって行われた。

$S_8S_8MODMOD$ 株に ^{60}Co を線源とする 5-15 Gy の線を照射し、4-10 日後の花粉を $S_8S_8modmod$ 株に蓄受粉した。 M_1 後代は基本的には S_8S_8Mm の遺伝子型を持ち、自家不和合性となるはずであるが、線照射によって M 遺伝子に変異、もしくは欠失すれば自家和合性になることが期待された。 M_1 後代 2343 個体を生育させ自然に種をつける個体を探した。

結果

自家和合性 *B. rapa* var. Yellow Sarson の遺伝分析

自家和合性株 Yellow Sarson の持つ m 変異が MOD と連鎖しているかを確かめるためにコーネル大学のグループの報告と同様にして野生型の自家不和合性 Rapid Cycling S_8S_8 株と Yellow Sarson C634 系統を掛け合わせた。Rapid Cycling 株は自家不和合性であり、小国由来の株よりも小型で、春化处理なしで花成の誘導が起こるため約 1 ヶ月で開花に至る。Rapid Cycling バックグラウンドの S_8S_8 株は中間的な形質を示し、小国由来の株よりもやや小型で春化处理が必要なく、約 40 日で開花する。この株を用いることにより、これまでの約半分の日数で表現型を観察することが可能になった。得られた F_1 植物体を自家受粉して F_2 種子を作出し、 F_2 125 個体について自家受粉を行い、柱頭における花粉管の進入を観察して自家不和合性、自家和合性に分類した。結果は自家不和合性株が 44 個体、自家和合性株が 81 個体でおおよそ 1:2 となり (図 5)、コーネル大学のグループが報告した自家不和合性株と自家和合性株が 9:7 となる結果とは一致しなかった。次にこれらの個体の S 遺伝子型と MOD の遺伝子型を PCR マーカーによって決定し、表現型との関連を調べた (表 1)。 $S_{12}S_{12}$ の遺伝子型を持った個体はすべて自家和合性となり、Hinata *et al.* の報告と一致して

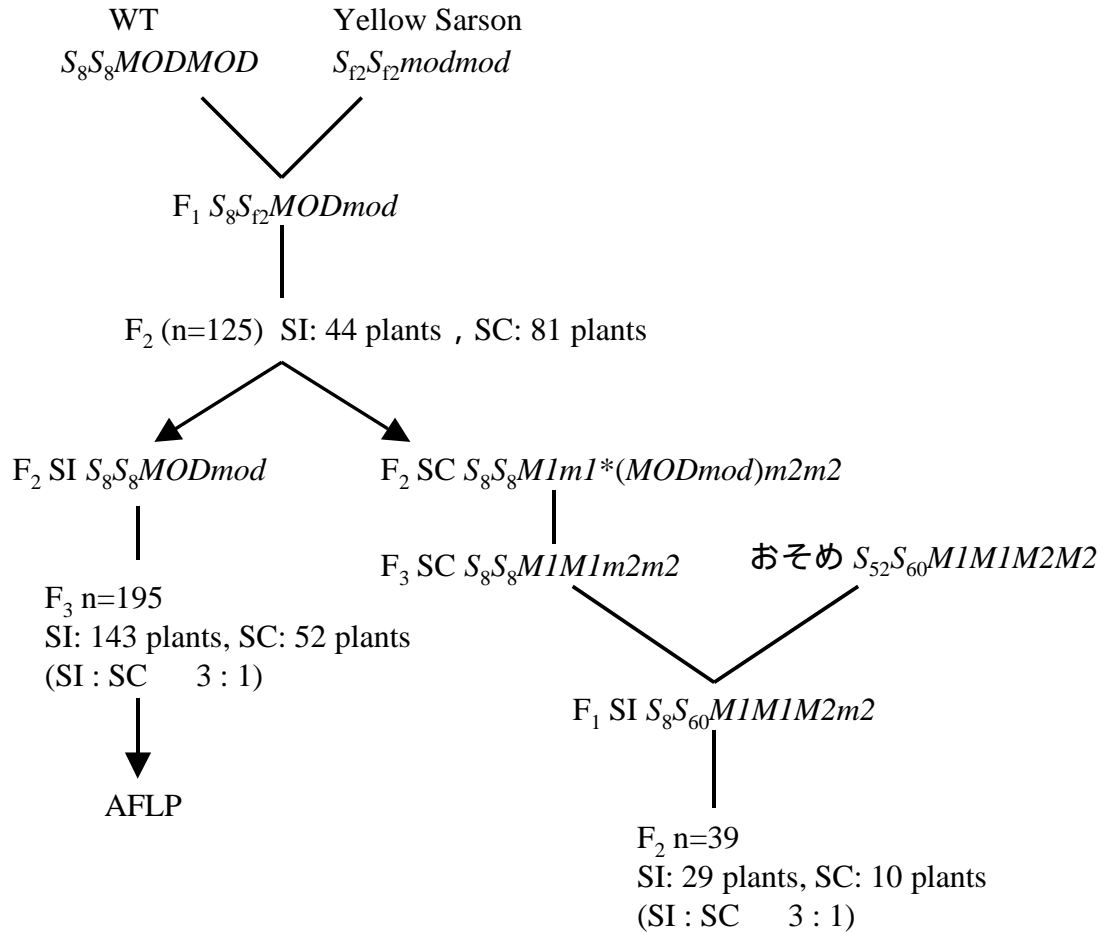


図5 *B. rapa* var. Yellow Sarsonの遺伝学的解析に用いた植物体の系譜
 **B. rapa* var. Yellow Sarson株を*S*遺伝子座と*M* (*modifier*)遺伝子座に変異を持つ $S_{f_2}S_{f_2}modmod$ 遺伝子型の自家和合性株と位置づけて解析を進めてきたが、野生株(WT)との雑種の自殖後代(F_2)の解析から新たな独立した遺伝子座上の劣性変異の存在が示唆されたため、従来想定されてきた*M*遺伝子座上の変異遺伝子(*mod*)を*m1*と改名し、また新たに見出された遺伝子座上の変異遺伝子を*m2*と命名して解析を続けた(本文参照)。

表1 F₂植物体の遺伝子型と自家不和合性(SI) / 自家和合性(SC) 表現型の解析。

S遺伝子型	M遺伝子型	SI	SC
S_8S_8	<i>MODMOD</i>	12	2
S_8S_8	<i>MODmod</i>	16	10
S_8S_{f2}	<i>MODMOD</i>	8	8
S_8S_{f2}	<i>MODmod</i>	8	21
$S_{f2}S_{f2}$	<i>MODMOD</i>	0	4
$S_{f2}S_{f2}$	<i>MODmod</i>	0	15
S_8S_8	<i>modmod</i>	0	6
S_8S_{f2}	<i>modmod</i>	0	11
$S_{f2}S_{f2}$	<i>modmod</i>	0	4
Total		44	81

数値は、各遺伝子型・表現型を持つF₂植物体の個体数を示す。

いた (Hinata *et al.*, 1983)。また *modmod* 個体もすべて自家和合性になり、*MOD* が *M* 遺伝子座と連鎖していることが示唆された。しかしながら、そのほかの遺伝子型の個体においても自家和合性となるものが多く観察され、*MOD* と連鎖する *M* 遺伝子座とは異なる遺伝子の変異も自家不和合性に関与していると予想された。この *M* 遺伝子座とは異なる遺伝子の変異については以下の「*MOD* とは連鎖しない *M* 遺伝子の遺伝分析」の項で詳述する。

MOD と *M* 遺伝子座の連鎖をさらに詳しく調べるために F_2 個体の中から遺伝子型が $S_8S_8MODmod$ であり、当初の期待通り自家不和合性を示す個体を選抜し、自家受粉により F_3 後代を 195 個体得た。 F_3 後代の表現型を調べたところ、自家不和合性株が 143 個体、自家和合性株が 52 個体となり、おおよそ 3:1 の比率となった。これら F_3 個体の *MOD* 遺伝子型を調べたところ、自家不和合性株はすべて *MODMOD* か *MODmod* の遺伝子型を示し、*modmod* である株は存在しなかった。一方、自家和合性株では 52 個体中 51 個体が *modmod* 遺伝子型であり、*MODmod* 遺伝子型の株が 1 個体見出された。この結果は *MOD* が *M* 遺伝子と強く連鎖しているが、*M* 遺伝子本体ではない可能性を示唆している。両遺伝子間の距離についての詳細な解析は以下の「*M1* 遺伝子座の遺伝地図の作製」の項で詳述する。

MOD とは連鎖しない *M* 遺伝子の遺伝分析

F_2 世代の中で *S* 遺伝子および *MOD* と連鎖する *M* 遺伝子だけでは説明できない表現型を示す個体について解析を進めた。Yellow Sarson には *S* 遺伝子および *MOD* とは連鎖しないもう一つの遺伝子に変異があると仮定し、*MOD* と連鎖している遺伝子を *modifier 1* (*m1*)、もう一つの遺伝子を *modifier 2* (*m2*) と命名した。野生型 S_8S_8 ホモ株と Yellow Sarson の F_1 個体は自家不和合性であることから *m2* 変異も劣性の変異と考えられる。これを確かめるために F_2 個体のうち遺伝子型が S_8S_8M1m1 で自家和合性の個体 (遺伝子型を $S_8S_8M1m1m2m2$ と想定) を 1 株選び、自家受粉により種子を得た。後代のうち *MOD* の遺伝子型より $S_8S_8M1M1m2m2$ と推定される株で自家和合性であった個体と自家不和合性栽培種のおそめ ($S_{52}S_{60}M1M1M2M2$) と掛け合わせ後代をとり、 F_1 個体 3 株が自家不和合性であることを確認した。 F_1 個体 ($S_8S_{60}M1M1M2m2$) を自家受粉させて得た F_2 39 個体について自家受粉をして花粉管の進入を観察したところ、自家不和合性株が 29 個体で自家和合性株が 10 個体あり、その割合が 3:1 となるため、この株は 1 遺伝子の劣性の変異を持つことが示唆された。*M2* 遺伝子がこれまでに報告されている自家不和合性に関わる遺伝子であるかどうかを確かめるために、この F_2 世代 39 個体の *S* 遺伝子、*MOD*、および *ARCI* についてそれぞれの遺伝マーカーを用いて分離の解析を行い、表現型と一致するかを調べた。もし *M2* 遺伝子が *S* 遺伝子、*MOD*、および *ARCI* のいずれかであった場

合、 F_2 個体のマーカーの遺伝子型は自家不和合株がおそめ由来のホモかヘテロになり、自家和合株は $m2$ 由来のホモになるはずである。連鎖解析の結果、いずれのマーカーもそのような分離は示さなかったため、 $M2$ は自家不和合性に必要な新しい遺伝子であることが明らかになった (図 6)。

これまで表現型の区別は花粉管の進入を指標に行っていたが、 $m2$ 変異体は $m1$ 変異とは異なる特徴的な表現型を示した。 $m2$ を分離した元株である F_2 個体 ($S_8S_8M1m1m2m2$) を自家受粉して得た後代のうち、 MOD の遺伝子型より $S_8S_8M1M1m2m2$ と推定される株と $S_8S_8m1m1m2m2$ と推定される株をそれぞれ 5 個体ずつ選抜し、それらの表現型を観察した。 $m2$ 変異のみをホモに持つと推定される $S_8S_8M1M1m2m2$ 個体は不和合受粉時 (S_8S_8 株の花粉を受粉させた時) に花粉管の進入は観察され、確かに自家和合性であるが、 $m1m1$ や $S_{f2}S_{f2}$ の変異株とは異なり、不和合受粉時にしばしば観察されるカロースの形成がみられ、進入する花粉管の数も少なかった (図 7)。一方、和合受粉 (おそめ $S_{52}S_{60}$ の花粉) では正常に花粉管の進入が観察されたため、不和合受粉時には何らかの自家不和合性反応は起こっているものの、最終的には花粉管が進入してしまうことが示唆された (図 7)。 $S_8S_8M1M1m2m2$ 遺伝子型の 5 個体はすべて同様の表現型を示した。一方、 $S_8S_8m1m1m2m2$ 株では不和合受粉時に $M1M1m2m2$ 株で観察されたようなカロースの形成や進入する花粉管の減少は起こらず、和合受粉と同じ表現型を示し、自家不和合性反応は起こっていないことが示唆された (図 7)。

$M1$ 遺伝子座の遺伝地図の作製

$M1$ 遺伝子は MOD と強く連鎖しているものの同一遺伝子ではないことが示唆されたため、 $M1$ 遺伝子座の詳細なマッピングを試みた。*B. rapa* では遺伝マーカーの整備はほとんどされていないため、AFLP を用いてマーカーの作製を行った。上述の遺伝分析で用いた F_2 $S_8S_8MODmod$ 株の後代 (F_3) の $MODMOD$ 株と $modmod$ 株をバルク化したゲノムを用いて 1280 通りのプライマーの組み合わせで AFLP を行った (図 8)。この 1 次スクリーニングにより、約 64,000 のバンドを解析し、325 の陽性バンドを確認した (表 2)。次に、陽性のプライマーの組み合わせについて $MODMOD$ と $modmod$ 株をそれぞれ 4 個体について AFLP を行う 2 次スクリーニングを行い、72 の陽性バンドを得た。これらの陽性バンドを 100 染色体について AFLP を用いて連鎖解析し、 $M1$ 遺伝子座周辺の AFLP マーカー 28 個 (表 3) を選抜して低精度の遺伝地図を作製した (図 9)。さらに詳細な遺伝地図を作製するために AFLP マーカー A15 の塩基配列を元に CAPS マーカーを作製した。 $S_8S_8MODmod$ を自家受粉させて得た後代 434 個体についてゲノムを抽出し、 MOD と A15 マーカーの遺伝子型を解析した。表現型が変わると予想される 485 染色体のうち、 MOD と A15 マーカーの間で組みか

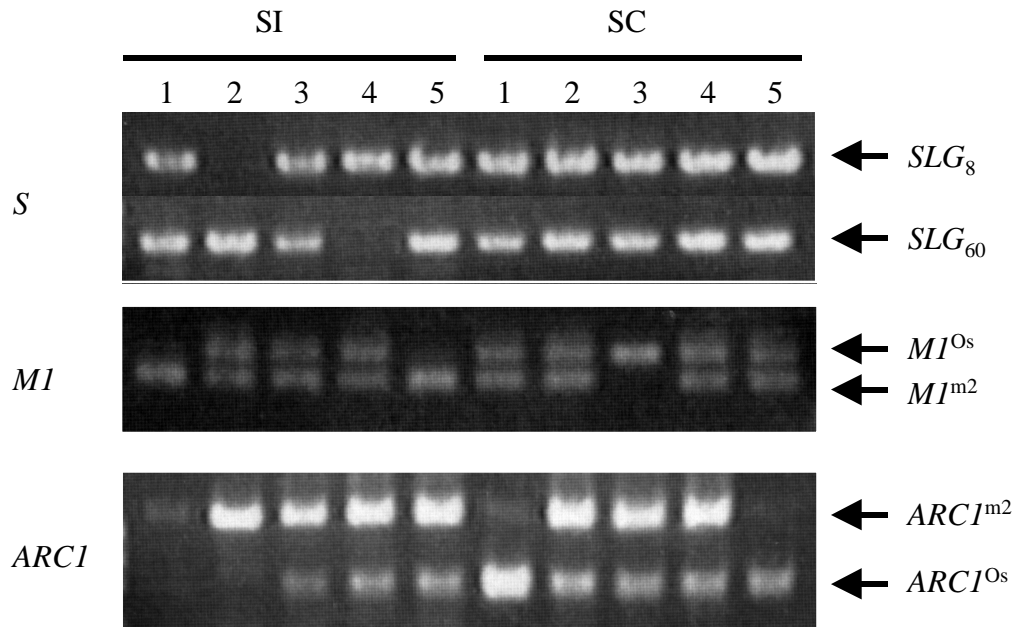
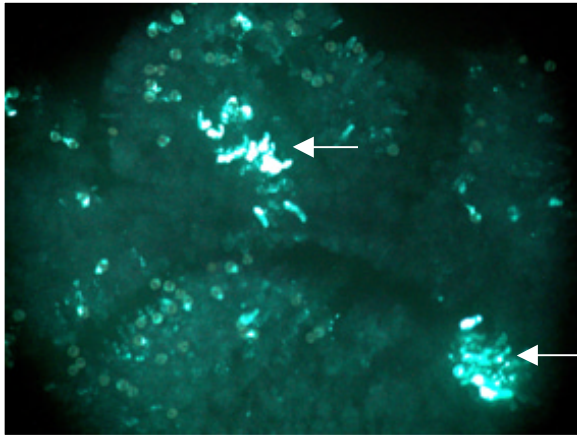
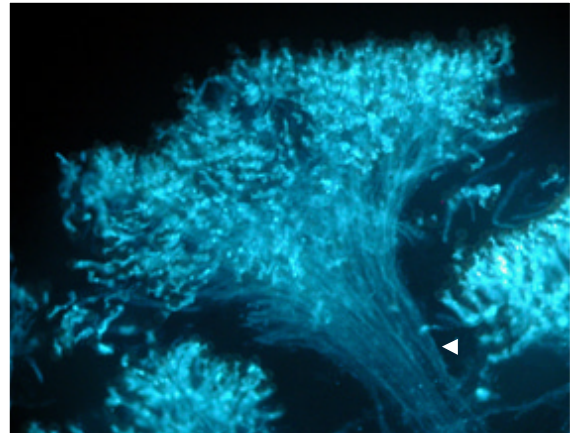


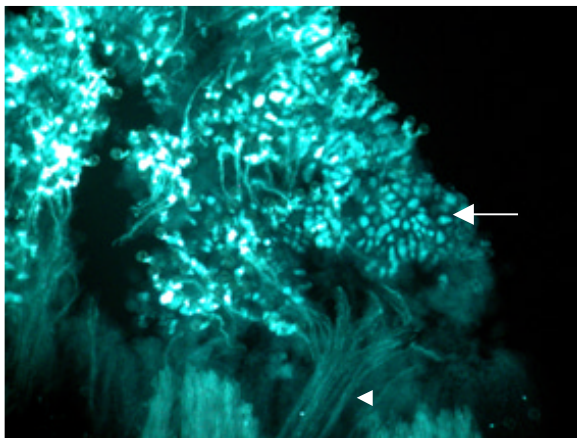
図6 *m2*遺伝子と自家不和合性関連遺伝子 (*S*, *MI*, *ARC1*) との連鎖解析。自家和合性*m2*変異株 ($S_8S_8MI^{m2}MI^{m2}ARC1^{m2}ARC1^{m2}m2m2$) と野性株おそめ ($S_{52}S_{60}MI^{0s}MI^{0s}ARC1^{0s}ARC1^{0s}M2M2$) 間の F_1 雑種 ($S_8S_{60}MI^{m2}MI^{0s}ARC1^{m2}ARC1^{0s}M2m2$) の自殖 F_2 後代39株について自家不和合性の表現型 (自家不和合性: SI、自家和合性: Sc) と*S*, *MI*, *ARC1*遺伝子との連鎖を解析した。ここでは10株について示す。*S*遺伝子型は、*SLG*₈および*SLG*₆₀の特異的PCR増幅により決定した。*MI*および*ARC1*遺伝子との連鎖は、*m2*変異株とおそめ由来の当該遺伝子中に存在した多型を利用して、各々PCR-SSLP法、PCR-RFLP法により決定した (材料と方法参照)。



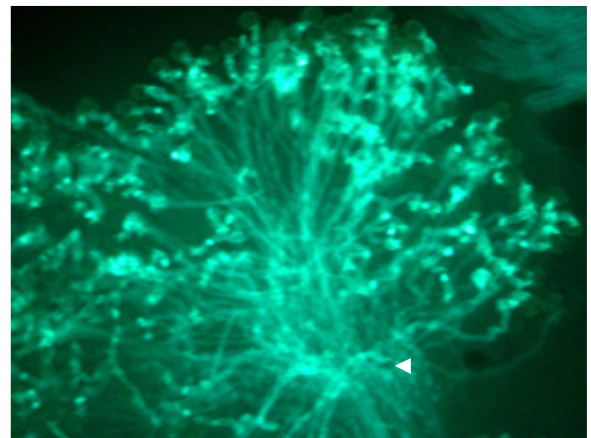
$S_8S_8M1M1m2m2$ 不和合受粉



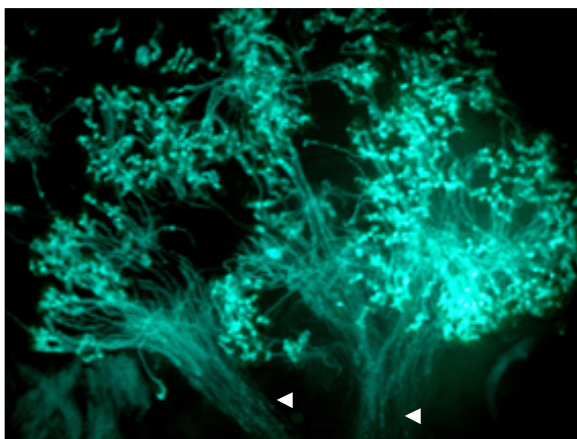
$S_8S_8M1M1m2m2$ 和合受粉



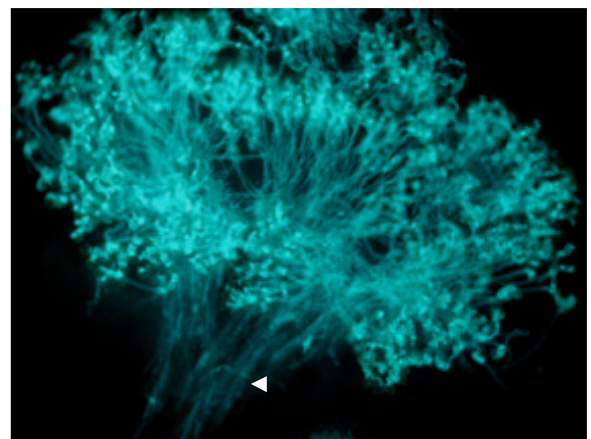
$S_8S_8M1M1m2m2$ 不和合受粉



$S_8S_8M1M1m2m2$ 和合受粉



$S_8S_8m1m1m2m2$ 不和合受粉



$S_8S_8m1m1m2m2$ 和合受粉

図7 $m1$ および $m2$ 変異体の受粉時の表現型。 $m2$ 変異体($S_8S_8M1M1m2m2$)および $m1, m2$ 二重変異体($S_8S_8m1m1m2m2$)の柱頭に不和合性花粉(S_8S_8)あるいは和合性花粉($S_{52}S_{60}$)を受粉後、アニリンブルー染色により花粉管の侵入(矢頭)および乳頭細胞におけるカロースの形成(矢印)を観察した。

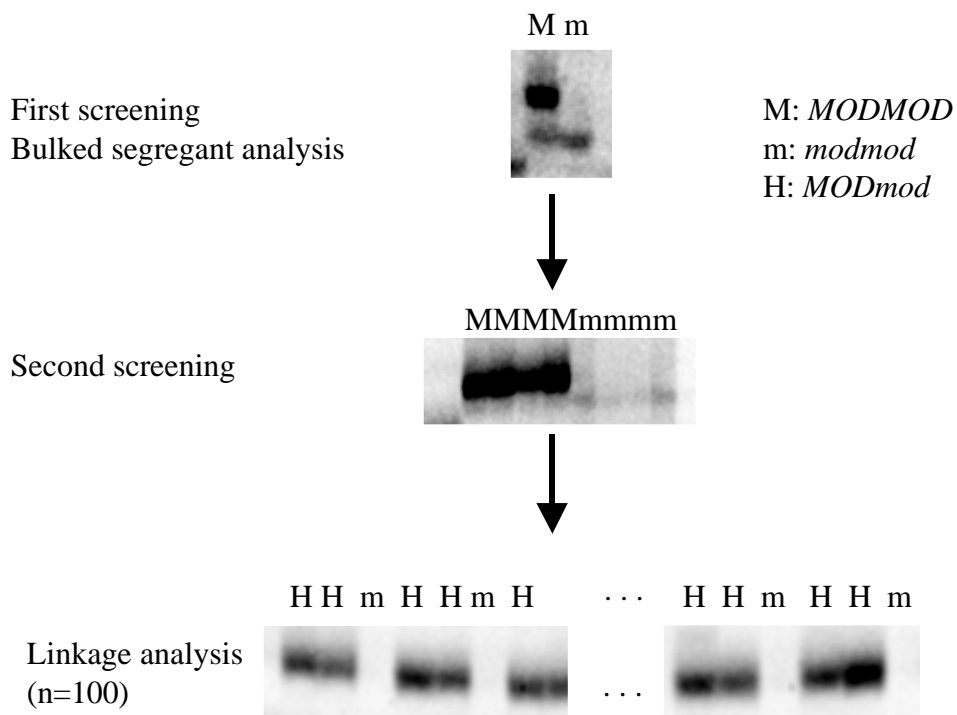


図8 *MI*遺伝子座近傍のAFLPマーカー探索の戦略。

表2 *MI*遺伝子座近傍のAFLPマーカーのスクリーニング

AFLP parameter	Number
Primer combinations	1,280
Approximate number of observed bands	64,000
Positive bands in first screening	325
Positive bands in second screening	72
AFLP markers tightly linked to <i>MI</i>	28

表3 *MI*遺伝子座近傍のAFLPマーカー一覧

Name	Primer F		Primer R		Size (bp)
	<i>Eco</i> RI (E-)		<i>Mse</i> I (M-)		
A3	3		3		231
A7	4		3		N.D.*
A9	5		11		231
A11	7		12		160
A12	8		9		100
A15	2		22		213
A16	3		17		N.D.
A21	1		34		N.D.
A22	1		36		348
A23	1		48		352
A24	5		36		N.D.
A25	5		52		N.D.
A26	9		57		N.D.
A27	20		36		N.D.
A28	20		53		300
A29	1		35		N.D.
A32	1		53		N.D.
A36	7		25		260
A40	10		43		474
A41	11		17		260
A47	1		34		N.D.
A49	1		48		348
A50	5		36		N.D.
A52	9		57		266
A53	20		36		N.D.
A54	20		53		295
A60	5		45		N.D.
A66	8		27		N.D.
A82	17		37		N.D.

*N.D.はクローニングしていないもの

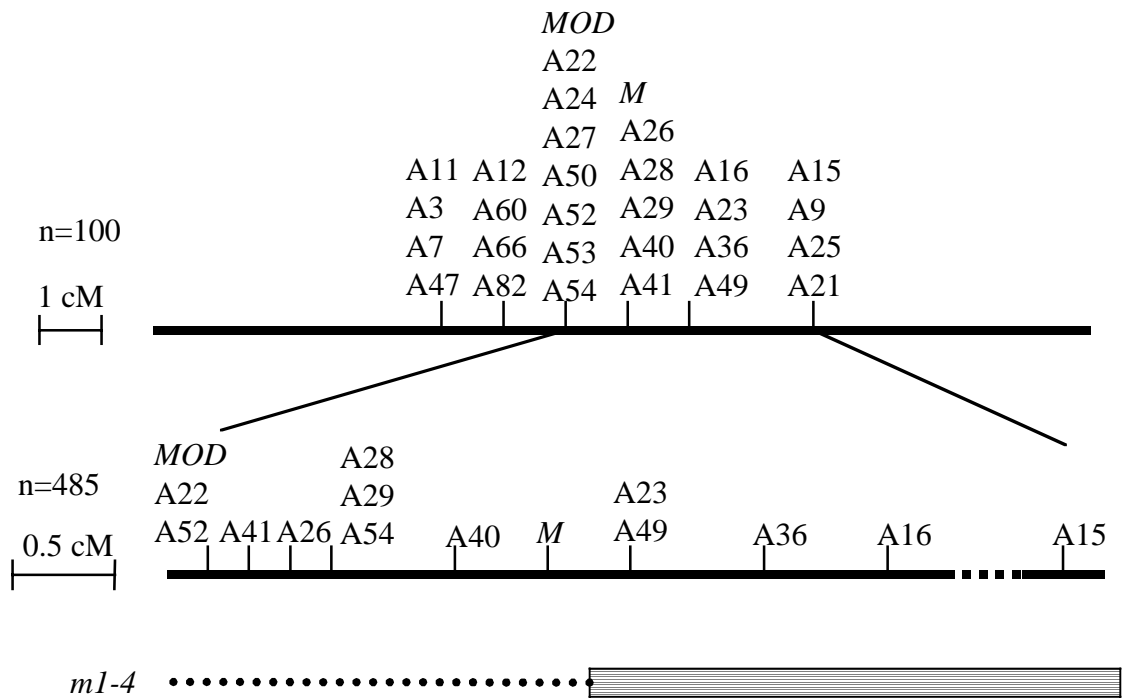


図9 *MI*遺伝子座の遺伝地図。A3-A82はAFLPマーカー。
 点線は 線照射により作出した*MI*遺伝子欠損株*ml-4*の欠失領域を示す（本文参照）。

えが起こっている 39 個体を選抜し、表現型を観察した。またこの 39 個体について AFLP 解析を行い、詳細な遺伝地図を作製した。その結果 *MI* 遺伝子はマーカー A40 と A23 の間 0.8 cM にマップされた (図 9)。この一連の解析の結果 9 個体の表現型が *MOD* の遺伝子型と一致しなかった。この結果は明らかに *MOD* が *MI* 遺伝子そのものではないことを示している。*MI* 遺伝子と *MOD* の遺伝距離はおおよそ 1.6 cM であった。

線変異株の作製

MI 遺伝子座について詳細に解析するために 線を用いて *MI* 遺伝子に変異を持つ新たな変異体の作製を試みた。 S_8S_8MIMI の花序に 5-15 Gy の 線を照射し、4-10 日後に成熟した花粉を S_8S_8mImI 遺伝子型の雌ずいに蓄受粉した。得られた M_1 世代は S_8S_8MImI 遺伝子型を有し、基本的に自家不和合性を示すが、もし *MI* 遺伝子に変異が入っていれば自家和合性になることが期待される。 M_1 後代 2,343 個体を解析して自家和合性株 1 株を選抜し、これを *mI-4* と命名した。線変異株は一般にゲノムに欠失を生じる。そこで遺伝マーカー A15、A23、A40 および *MOD* について欠失の有無を確認したところ、A23 から *MOD* までの広いゲノム領域の欠失が認められた (図 9)。本結果はこの欠失領域に *MI* 遺伝子が座乗することを裏付ける結果ではあるが、欠失領域が大きすぎるため、これ以上の解析は行わなかった。

考察

自家不和合性シグナル伝達において、SRK の下流で重要な働きをしていると考えられる *MI* 遺伝子の本体を明らかにするために自家和合性 *B. rapa* var. Yellow Sarson C634 と S_8S_8 系統を掛け合わせ遺伝学的解析を行った。コーネル大学の報告では C634 株は S_8S_8 と掛け合わせて得た F_2 後代は自家不和合性株と自家和合性株が 9 : 7 に分離し、自家和合性になる原因は *S* 遺伝子とアクアポリン遺伝子 *MOD* にあると結論づけた (Nasrallah *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1997)。しかしながら、今回独立して行った解析では、125 個体を解析して自家不和合性株と自家和合性株の割合は 1 : 2 であり、先の報告とは大きく異なっていた。また、アクアポリン遺伝子 *MOD* は *MI* 遺伝子とは確かに連鎖していたが、詳細なマッピングの結果 *MI* 遺伝子本体ではないことが確かめられ、*MI* 遺伝子は AFLP マーカー A23 と A40 の間 0.8 cM にあることが明らかになった。アブラナでは 1 cM が 500-700 kbp とされているため (Sadowski *et al.*, 1996)、物理距離にして 400-560 kbp 程度まで *MI* 遺伝子座を絞り込むことができたと期待される。また、*MI* と *MOD* の遺伝距離は 1.6 cM であり、およそ 800-1,100 kbp 離れているとも推定される。

F_2 個体の解析は Yellow Sarson が *S* 遺伝子と *MI* 遺伝子の他にも自家不和合性反応

に必須な遺伝子に変異していると考えられる。本株に独立した3つの劣性変異が含まれていると仮定すると、野生株とのF₂後代は自家不和合性株と自家和合性株が27:37となるはずであり、4つの劣性変異の存在を仮定すると81:175となる。実験結果は44:81であり、統計学的には3つ($\chi^2 = 2.45$)よりは4つ($\chi^2 = 0.73$)の変異があると考えた方が良いと思われる。また、コーネル大学の報告によれば、Yellow SarsonはMODとSRK₂の変異に加え、S遺伝子座のごく近傍に雌ずい側の自家不和合性反応が部分的に抑えられる劣性の原因遺伝子の存在が示されているので、もしこれが本当ならばYellow Sarsonは4-5つの自家和合性変異遺伝子を持つことになる

(Casselmann *et al.*, 2000)。しかし、このS遺伝子座近傍の自家和合性の原因遺伝子についての報告はない。これまでに報告されている柱頭側で自家不和合性反応に必要な因子はS遺伝子(SRK)、M、およびARC1があり(Takasaki *et al.*, 2000; Hinata *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 1999)。今回の解析で見つかったM2遺伝子はこれらの遺伝子とは連鎖しておらず、新しい自家不和合性関連遺伝子座であることが示唆された。m2変異はM1遺伝子と同様に、柱頭側で劣性の変異であり、M2遺伝子産物はSRKの下流で自家不和合性の情報を正に伝達する未知の因子をコードしていると考えられる。しかしながら、m2変異株の柱頭では自家受粉時に自家不和合性と相関して検出されるカロースを形成する乳頭細胞が出現し、自家和合性を示すとはいえ、他家受粉よりも進入する花粉管数は少ないことから、自家不和合反応が部分的に進行しているものと予想される。m1とm2の2重変異株ではカロースの形成は起こらず、他家受粉と同程度の花粉管が進入していく観察結果はSRKシグナル伝達において、M2はM1の下流で働いており、M2の上流でカロース形成を誘導し、花粉管の進入を部分的に阻害する情報伝達経路とM2を含む他の自家不和合性情報伝達経路が分岐している可能性を示唆している。m2変異は完全に自家和合性とはならないため、自家不和合反応時における役割はSRKやM1と比べると補助的なものであるのかもしれない。もしくはm2変異ではその機能が完全には消失していない可能性、他の因子がm2変異を相補している可能性も考えられる。従って、M2遺伝子の解析も今後の重要な研究課題であると思われるが、本研究では以降の章において、完全な自家和合性を引き起こすm1変異に焦点を絞って解析を進めた。

第2章 MI 遺伝子のポジショナルクローニング

序

第1章においてはアクアポリン遺伝子 *MOD* が *MI* 遺伝子本体ではないことを示すと共に、*MI* 遺伝子座を 0.8 cM の領域に絞り込んだ。ここでは *MI* 遺伝子のポジショナルクローニングについて示す。*B. rapa* では *Arabipopsis* のようなゲノム情報はほとんどないため、まず *MI* 遺伝子座に最も近いマーカーから染色体歩行を行った。それにあたり、BAC クローンのスクリーニングを迅速に行うために PCR を用いたスクリーニングシステムの構築を行った。続いて、*MI* 遺伝子座の物理地図の作製、*MI* 遺伝子座の絞り込み、BAC クローンの塩基配列の決定を経て、候補遺伝子を見出した。通常、候補遺伝子の導入によって変異形質が相補されるかを確認して原因遺伝子を特定するが、*B. rapa* では特定の系統を除いて形質転換体の作出は困難であるため、ここでは新たな試験法を確立することによって相補試験を行い、原因遺伝子を特定した。

材料と方法

材料

組みかえの解析には1章で作製した F_3 株 S_8S_8M1m1 遺伝子型の個体を自家受粉して得た後代を用いた。1章で作製した F_2 株の中の S_8S_8m1m1 遺伝子型を持つ個体をさらに2回野生型の自家不和合性 S_8S_8M1M1 と戻し交配し、 S_8S_8 バックグラウンドの $m1m1$ 個体を作成し、後の解析に用いた。 S_9S_9m1m1 は S_8S_8m1m1 と S_9S_9M1M1 を交配させた F_1 S_8S_9M1m1 を自家受粉させた後代から得た。

BAC クローンのスクリーニング

当研究室においてすでに *B. rapa* S_{12} 系統の 70,000 クローンの BAC ライブラリーが構築されている (Shiba *et al.*, 2003)。この BAC ライブラリーは平均インサートが 70 kbp で *B. rapa* の約 7 ゲノム分をカバーしている。より迅速な BAC クローンのスクリーニングを可能にするため、4次元 PCR 法によるスクリーニング系 (Asakawa *et al.*, 1997) を構築することにした。BAC クローンは大腸菌のグリセロールストックとして、約 730 の 96 ウエルタイタープレートに入っていた。今回はこのうちの 700 枚を用いた。Asakawa *et al.* の方法に従い、プレートを 100 枚ずつの 7 セット (1-7 セット) に分け、セットごとに大腸菌のストック液を 10 μ l ずつ集め、次のような 4 つのプールを作製した。1次元めはプレートナンバーの 1 の桁が同じ 10 枚のプレート上のクローンを集めたプール [(1, 11, ..., 91), (2, 22, ..., 92), ..., (10, 20, ..., 100)]、2次元めはプレートナンバーの順に 10 枚分のクローンを集めたプール (1-10、

11-20、...、91-100) 3次元めはプレート 100 枚分の 1 列ごとに集めたプール (1-12 列まで) 4次元めはプレート 100 枚分の 1 行ごとに集めたプール (1-8 行まで) である。それぞれ集めたストック液のプールに含まれるクローン数は 1 次元、2 次元めは 960 clones/pool で、3 次元めは 800 clones/pool、4 次元めは 1,200 clones/pool となる。合計 280 (40×7) のプールより、アルカリ SDS 法を用いて各々プラスミドを抽出した。プラスミドは 100 μl の TE に溶かしてストック液とし、-80 に保管した。実際の 4 次元 PCR 法によるスクリーニングには、ストック液を TE で 100 倍に希釈したものをテンプレートとして用いた。また、ストック液の 1 部を混ぜ合わせ、各セット 100 プレート分 (1-7 セットまで) のプラスミドを集めたスーパープール (9,600 clones/pool) も作製した。

BAC のスクリーニングはまずスーパープールをテンプレートに PCR を行い、陽性クローンの含まれるセットについて 4 次元 PCR を行った。PCR は 94 °C、5 分のプレ PCR を行った後、94 °C で 30 秒、55 °C で 30 秒、68 °C で 1 分のサイクルを 40 回行った。目的とする遺伝子断片の増幅は 1% アガロースゲルを用いた電気泳動法により確認し、陽性クローンを特定した。スクリーニングシステムが機能するかを確認するために当研究室の EST である *S1010-13-C10* 遺伝子でスクリーニングを行った。*S1010-13-C10* を増やすプライマーは EST4F (5'-CTCGTGCTTCAACATTTTCC-3') と EST4R (5'-GGAGATGGACGCTGTTTGCT-3') を用いた。

染色体歩行

4 次元 PCR によって選抜された陽性クローンからのプラスミド精製はポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により行った。培養した大腸菌からアルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出した後、得られたプラスミド溶液 100 μl に等量の PEG 溶液 [20% (w/v) PEG 6000 (SIGMA) 2.5 M NaCl] を加え、4 °C に 1 時間静置した。15,000 g で 20 分遠心した後、70% エタノールでリンス、乾燥させた後、プラスミドを TE に再溶解させた。インサートの大きさの確認は *NotI* を用いてインサートを切り出した後に、パルスフィールドゲル電気泳動法により行った。パルスフィールドゲル電気泳動は CHEF Mapper (Bio Rad) を用いて行い、オートアルゴリズムモードにて 20-200 kbp 領域の DNA 断片を分離した。分離には 1% のアガロースゲル (SeaKem GTG agarose, FMC) 泳動バッファーには ×0.5 TBE、マーカーには Lambda Laddar PFG Markaer と Mid Range I PFG Marker (New England BioLabs) を用いた。

BAC のエンドシーケンスは M13 プライマーを用いて決定した。BAC のプラスミド 500 ng をテンプレートとして BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) をもちいて 96 °C で 30 秒、55 °C で 10 秒、60 °C で 4 分の PCR サイクルを 35 回行い、得られた増幅断片をエタノール沈殿させた後、水に溶解し、ABI3100 シ

ーケンサーで塩基配列を決定した。決定したエンドシーケンスを元に新しくプライマーを作製し、これと隣接する BAC クローンのスクリーニングを繰り返すことで、BAC コンティグを作製した。用いたプライマーは次の通りである。AFLP マーカー A23 で用いたプライマーは A23F と A23R、A40 からは A40F と A40R、BAC Y203-1 からは Y203-1RF (5'-ACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3') と Y203-1RR (5'-CATATGGCACTGCAATGGGC-3')、BAC 218-3 からは 218-3FF (5'-GACAGTGTGACATGAAACGC-3') と 218-3FR (5'-TCTATTGACTCGTTATCATG-3')、BAC 238 からは 238RF (5'-ATCATCTGGATTATGCGCTG-3') と 238RR (5'-AATGTAGCTCCATTGTGAAC-3')、BAC243 からは 243RF (5'-AAGCTTGCTCAGGAAGCGTC-3') と 243RR (5'-AATACACGTCGAACAGTAGT-3')、BAC 251-22 からは 251FF (5'-AATGCAGCCGCTATGTCTGA-3') と 251FR (5'-TCTCAGAAGGTTACATGGTA-3')、BAC 240-2 からは 240-2RF (5'-TGGTTGATTTCTTGTCAGAC-3') と 240-2RR (5'-CAATGTAACAGTGTGGCCAG-3')。

BAC 間の配向とオーバーラップしている距離は Long PCR (*LA taq*) によって決定した。すなわち、BAC のスクリーニングで用いた上記プライマーと M13F、R プライマーを組み合わせ、陽性クローンをテンプレートとして、94 で 5 分のプレ PCR の後、94 で 30 秒、55 で 30 秒、68 で 10 分もしくは 20 分のサイクルを 30 回繰り返した。0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動法により解析し、おおよその大きさを確認した。

MI 遺伝子座の絞り込み

MI 遺伝子座をさらに絞り込むためのマーカーを作製した。AFLP マーカー A36 から新たに CAPS マーカーを作製し連鎖解析に用いた。用いたプライマーは A36-2F (5'-TTTGCTGTAGACAGACTGAC-3') と A36-2R (5'-GGAATGCTCCTTTGCAGCGG-3') で、PCR により増幅させた後、フラグメントを *EcoT22I* で切断し、1% アガロースゲル電気泳動で確認した。B1-B7 は BAC のエンドシーケンスと BAC251-22 のシーケンスを元にしたシーケンスマーカーであり、フラグメントの増幅とシーケンスに用いたプライマーは B1 が 240-2RF と 240-2RR、B2 は 240-2FF (5'-TTATACAGGACGTGACAGGA-3') と 240-2FR (5'-CGTGCGGTTGCACGGGTCAA-3')、B3 は GSTF (5'-AGCGGATCTGATTCTCTCCC-3') と GSTR (5'-ATGGCGGAGAAAGAAGAAGT-3')、B4 は 8-15F (5'-TGGCTGTACAATGCATCATG-3') と 8-15R (5'-GTTCATCACAACTCCTGCAA-3')、B5 は RINGF (5'-CAACAAATCATTGCATTACA-3') と RINGR (5'-CTTCACCGGTGGCAGACGGT-3')、B6 は 243RF と 243RR、B7 は 238RF と 238RR である。

1章で作製した F₃ 個体 S₈S₈Modmod 株を自家受粉した子世代 1,591 個体についてゲノムを抽出し、MOD と A36 CAPS マーカーについて遺伝子型を調べた。表現型が変わると期待される染色体は 1,672 あり、先のマッピングで用いたものとあわせて 2,157 となった。M1 遺伝子は A23 と A40 の間にあるので MOD と A36 の間で組み変わった個体をまず PCR マーカーで選抜し、その中で A23 と A40 の間で組みかえが起きている個体 28 個体を選抜した。組みかえ個体は表現型の観察および、新たに作製したマーカーを用いた組みかえ地点の解析を行った。

BAC クローンの塩基配列の決定

BAC 251-22 の塩基配列の決定は shot-gun 法で行った。Large-Construct Kit (QIAGEN) で精製した BAC は、HydroShear (トミー精工) を用いて 1.5-2.5 kbp に機械的に剪断し、T4 Polynucleotide kinase によって末端をリン酸化した後、T4 DNA Polymerase を用いて平滑化した。この DNA 断片は EcoRV で切断し、CIAP (Calf intestine Alkaline Phosphatase) で脱リン酸化された pBluescript II SK (+) に Ligation Pack (ニッポンジーン) を用いてサブクローン化し、大腸菌に形質転換した。M13 プライマーを用いてコロニー PCR でインサートを増幅し、PCR product pre-sequencing kit で処理した後、同プライマーで塩基配列を決定した。1,440 の塩基配列の断片をアッセンブルソフトの AutoAssembler (PE Applied Biosystemes) を用いてアッセンブルし、コンティグを作製した。コンティグ間の配列はプライマーウォーキングにより塩基配列を読みとり、全配列を完成させた。シーケンスに用いたプライマーは 8-15F (5'-AATAAATTATAGTCATGATCACG-3')、10F (5'-AACCCGTATTTCAAAACTGG-3')、10R (5'-CGAATCCAAGTGGAGAACCA-3')、8F (5'-CTACATGCAGACAGTTTCGC-3')、8R (5'-AGATCGATCTTTACTAGATGTA-3')、28F (5'-GTGTCCCAAGTAAGATAGCC-3')、28R (5'-TCACGACACCGTCTGCCACC-3')、61F (5'-GTAGCACTCAAGGCTCAAAG-3')、61R (5'-AGAATTTAAGCCTAATTCAT-3')、57F (5'-GGATATCCAGATCCATAAGT-3') である。

RT-PCR

M1 遺伝子座の候補遺伝子について RT-PCR を行い、発現部位の解析を行った。B. rapa S₈ ホモ個体の各組織から採取したサンプルから ISOGEN (ニッポンジーン) を用いてトータル RNA を抽出し、各 1 µg をテンプレートとして Super Script II RNaseH Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写した。RT-PCR の反応条件はプレ PCR (94°C、5 分)、94°C を 30 秒、55°C を 30 秒、68°C を 1 分のサイクルをコントロールのコピキチンでは 25 回、その他は 30 回行った。コピキチンを増やすプライマーは ubiF (5'-ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC-3') と ubiR (5'-

ACCACCACGGAAGACGGAG-3') ORFA は ORFAF (5'-CGAACCAAATATGACTTTCC-3') と ORFAR (5'-GTTTGGAGAGAGGTTGGGTT-3') ORFB は ORFBF (5'-TGCTGCTATAGAAATGGTGA-3') と ORFBR (5'-GCTGACACTGTTGCAGAGTT-3') ORFC は ORFCF (5'-GGCAATTATACATATATGTA-3') と ORFCR (5'-TCAGTTTCTCTGTGGTGAAG-3') ORFD は ORFDF (5'-AACGCTAAAAGGCCATTATC-3') と ORFDR (5'-AGGACGTCAGTTTCAAGGAA-3') ORFE は ORFEF (5'-AAAAAGCGACAAGGCCATTC-3') と ORFER (5'-GTCAGTTTCAAGGAGGCATT-3') ORFF は ORFFF (5'-TCTCTGATTCAAGCATGTGG-3') と ORFFR (5'-TATCTTGACAACGTTGGTTA-3') ORFG は ORFGF (5'-ATGGGTTTTGTGAAAAAAGTG-3') と ORFGR (5'-TTCATCCTCTAAGCAGTAACCGAT-3') ORFH は ORFHF (5'-GTAACATCAAATATGTCTGG-3') と ORFHR (5'-GCCTGGACCAGATTCTCCCA-3') ORFI は ORFIF (5'-CAAGATCCTAGACAAAACAC-3') と ORFIR (5'-ATGGTCAATATTATAATCTG-3') ORFJ は ORFJF (5'-ACTGATATGTGGACCCGATC-3') と ORFJR (5'-GTGAGGCAGGTGATGTAAAC-3') ORFK は ORFKF (5'-ATGTGAATTAATTACCATGT-3') と ORFKR (5'-TGGGGATTTGCCTGCAATGA-3') ORFL は ORFLF (5'-AAATCGGAAACGATTCAACC-3') と ORFLR (5'-GGCGTTAAGCGAATCAGCGG-3') である。PCR 産物は 1%のアガロースゲルで電気泳動し、観察した。

ノーザン解析

トータル RNA は ISOGEN によって抽出し、各 20 µg を 20 µl のサンプルバッファー [1×MOPS バッファー (20 mM MOPS pH 7.0、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA)、17.5%ホルムアルデヒド、50%ホルムアミド} に溶かし、65 °C で 15 分ヒートショックをかけた。サンプルは 18%ホルムアルデヒド、1×MOPS バッファーを含む 1%アガロースゲルにアプライし、1×MOPS バッファー中で電気泳動して分離、エチジウムブロマイドで染色した後、20×SSC (333 mM クエン酸ナトリウム、333 mM NaCl) を用いてニトロセルロース膜 (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) にプロットした。ORFG のプローブはプライマー-STKF0 (5'-GCTCATTTTAGTTGCCAGAGG-3') と STKR0 (5'-GGCGTTAAGCGAATCAGCGG-3') を用いて RT-PCR で全長 cDNA を増やしたものを pGEM T-Easy にクローニングし、同じプライマーセットで PCR 増幅させたものを用いた。プローブのアルカリフォスファターゼラベルとハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct (Amersham Pharmacia Biotech) のプロトコルに従って行った。

発現タンパク質

S₈ および Yellow Sarson の ORFG は GST 融合タンパク質として発現させた。それぞれ、プライマー-MKBam40F (5'-TGGGATCCCCATGGGAAGCAAATGCTCTTC-3') と EcoMAR (5'-TTGAATTCTCAGACAAACAGAGGCGAAGC-3') を用いて PCR 増幅した後、*Bam*HI と *Eco*RI で切断し、同様に処理した pGEX-5X-3 (Amersham Biosciences) にクローニングした。プラスミドは発現用大腸菌 Epicurian Coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) に形質転換した。それぞれ 50 ml の 50 µg/l のアンピシリンを含む LB 培地 [1% Bacto Tryptone (BD), 0.5% Bacto Yeast Extract (DIFCO), 1% NaCl] で一晩前培養した。培養液を 500 ml の同培地に移し、室温で 3 時間培養した後、0.1 M の IPTG (Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside) を 500 µl 加え、目的タンパク質の合成を誘導した。さらに 1 時間培養した後、遠心 (3,000 g、10 min) して集菌し、40 ml の STE (10 mM Tris-HCl pH 7.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT) とプロテアーゼ阻害剤 (Complete、Roche) を加えて懸濁したのち、アストラソン超音波細胞破碎機 (MISONIX) を用いて 3 分間氷上でソニケーションした。破碎液に TritonX-100 を 1% になるように加え、30 分室温で攪拌した後、8,000 g で 10 分間遠心した。上清に同じバッファーに平衡化させた 1 ml の 50% Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) を加え、30 分攪拌した後、遠心して上澄みを除き、1% TritonX-100 を含む STE で 3 回、STE で 2 回洗浄した。目的タンパク質は 0.5 ml の溶出液 (10 mM 還元型グルタチオン、1×STE) で 3 回溶出した。

抗体の作製

抗体作製用の MLPK タンパク質は同じ pGEX ベクターを用いて作製し、ウサギへの免疫は SUKA•FLAT に依頼した。抗体の精製は血清を硫酸沈殿法により IgG 画分を粗精製した後、GST を結合させたアフィニティーカラム (HiTrap NHS-activated HP、Amersham Biosciences) を通して、GST に対する抗体を除いた後、GST-MLPK を結合させた同カラムに吸着させた。抗体は 100 mM グリシン塩酸 (pH 2.5) で溶出し、1 M Tris-HCl (pH 9.5) で中和した後、PBS で平衡化させた PD-10 カラムを通して抗体液とした (0.8 mg/ml)。

リン酸化実験

精製した GST 融合タンパク質はリン酸化バッファー [50 mM HEPES、100 mM NaCl、10% グリセロール、5 mM MgCl₂、5 mM MnCl₂、0.1% TritonX-100、50 µCi [γ -³²P]ATP (Amersham Biosciences)] 中で室温 10 分反応させた。等量の 2×SDS-PAGE サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、1% SDS、7% グリセロール、5% メルカプトエタノール) を入れ、96 °C で 3 分置いた後、SDS-PAGE に供した。バッファーは 25 mM

Tris-HCl、192 mM グリシン、0.1% SDS を用い、ゲルは 10% アクリルアミドゲル（第一化学薬品）を用いた。泳動後のゲルは GelCode Blue Stain Reagent（PIERCE）で染色し、乾燥した後、イメージングプレート（富士フィルム）に感光させ、BAS-2500 IP Reader（富士フィルム）で読みとりを行った。

ウエスタンブロッティング

サンプルは SDS-PAGE で分離した後、トランスブロット SD セル（Bio Rad）を用いてニトロセルロースメンブレン（Amersham）にブロットした。メンブレンは 5% のスキムミルクを含む TBS（25 mM Tris-HCl pH7.5、140 mM NaCl、2.68 mM KCl）で 1 時間ブロッキングした後、0.5% スキムミルクを含む TBS に移して抗体と 1 時間反応させた。TTBS（0.05% Tween 20、1×TBS）で 5 回洗浄した後、HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体（Bio-Rad）で検出した。MLPK 抗体と HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体は 1/2000 に薄めて用いた。HRP の検出は ECL plus Western Blotting Detection System（Amersham Biosciences）を用い、X 線フィルム（Hyperfilm MP、Amersham Biosciences）に感光させた。

相補試験

相補試験をするため、*m1m1* 株の柱頭にパーティクルガンで *MLPK* 遺伝子を打ち込み、一過的に発現できる系を構築した。柱頭でターゲット遺伝子を発現させるため、*SLG9* 遺伝子のプロモーターを含む 3.2 kbp のフラグメントを pBI221（Clontech）の *SmaI/SacI* 部位に入れ、pSLG9 ベクターを構築した。次に *MLPK* と *RFP*（Clontech）遺伝子を pSLG9 の *SmaI/SacI* 部位に入れ、Midi-V100 Ultrapure Plasmid Extraction System（VIOGENE）を用いてプラスミドの精製を行った。

開花 1 日前の花柱（*S₈S₈m1m1* と *S₉S₉m1m1*）は花弁、がく、雄ずいを取り除き、培地 [1×Murashige and Skoog Plant Salt Mixture（Wako）、1×Gamborg B5 ビタミン、3% スクロース、0.2% phytigel（SIGMA）] に挿しておいた。プラスミドは直径 1 μm の金粒子（マイクロキャリアパッケージ、Bio-Rad）にコートし、1 shot で 100 μg の金粒子を撃ち込んだ。プラスミドはコントロールの *RFP* は 2 μg、*RFP* と *MLPK* を同時に打ち込んだものは *S₈S₈m1m1* では *RFP* 1 μg、*MLPK* 2 μg、*S₉S₉m1m1* では *RFP* 1 μg、*MLPK* 1 μg をコートした。パーティクルガンは PDS-1000/He particle delivery system（Bio-Rad）で行い、900 psi のラプチャーディスク（Bio-Rad）を用いて各サンプルに 2 回打ち込んだ。22 で 18 時間置いた後、倒立型の蛍光顕微鏡（Carl Zeiss）下で *RFP* の発現している乳頭細胞を探し、マイクロマニピュレーターを用いて不和合花粉（*S₈S₈* もしくは *S₉S₉*）もしくは和合花粉（*S₅₂S₆₀*）を *RFP* の発現している細胞にのせた。2（*S₈S₈m1m1*）もしくは 4（*S₉S₉m1m1*）時間後に乳頭細胞への花粉管の進入を

観察した。

結果

4次元 PCR 法による BAC クローンのスクリーニングシステムの構築

1章でのマッピングの結果 *MI* 遺伝子座はマーカー A23 と A40 の 0.8 cM 内まで絞られたので、これを起点として BAC クローンによる物理地図の作製を試みた。それに先立ち、BAC のスクリーニングを迅速に進めるための 4次元 PCR システムの構築をした(図 10)。このシステムでスクリーニングが可能かどうかを *1016-13-C10* 遺伝子(当研究室の EST)で試してみた。この方法では 2段階で PCR を行い、1段階目では 9,600 クローンのスーパープール 7つをテンプレートに PCR を行った。スーパープール 1 の約 400 bp 付近にコントロールのゲノムから増やしたバンドと同じ大きさのバンドの増幅が観察された(図 11A)。2段階目ではスーパープール 1 に対応する 100 枚のプレートの 4次元プール(1D-4D)について PCR を行った(図 11B)。1D と 2D はそれぞれプレートの 1 の桁と 10 の桁を示し、3D と 4D はプレートの横の列と縦の列の番地を示す。1D から 4D までそれぞれ 1 本ずつ 400 bp のバンドが観察され、それぞれサブプール 7、9、12、2 であった。スーパープールはプレートの 100 の桁を示すため、目的のクローンはプレート No. 087 のレーン 12B となる。このクローンをコロニー PCR することによりスクリーニング結果が正しいことが確認されたため、このシステムで染色体歩行することにした。

MI 遺伝子座の物理地図の作製

A40 と A23 マーカーから BAC クローンのスクリーニングを行い、得られた BAC クローンの大きさをパルスフィールドゲル電気泳動で確認した。また、BAC のエンドシーケンスを読みとり、それを元に新しいプライマーを設計し、BAC 間で Long PCR を行った。BAC のインサートの大きさ、エンドシーケンスの *Arabidopsis* とのシンテニー、Long PCR による BAC のエンドシーケンス間の距離から最も端のクローンを予測し、そのエンドシーケンスのプライマーセットを次のスクリーニングに用いた。またキメラクローンによる誤りを防ぐために、各 BAC のエンドシーケンスを用いて新しいマーカーを作製し、*MI* 遺伝子座と連鎖していることを確認した。このステップを繰り返して約 500 kbp の物理地図の作製を行った(図 12、表 4)。

MI 遺伝子座を絞り込むため、さらに組みかえが起こった植物体のスクリーニングを行った。新たに 1,672 染色体について解析し、A23 と A40 の間で組みかえが起こっている 24 個体を選抜した。1章で解析したものと併せて 2,157 染色体を解析し、合計 28 個体の組みかえ個体の表現型を観察した。各組みかえ個体について BAC のエンドシーケンスを元に作製したマーカーを用いて組みかえ地点の解析を行ったと

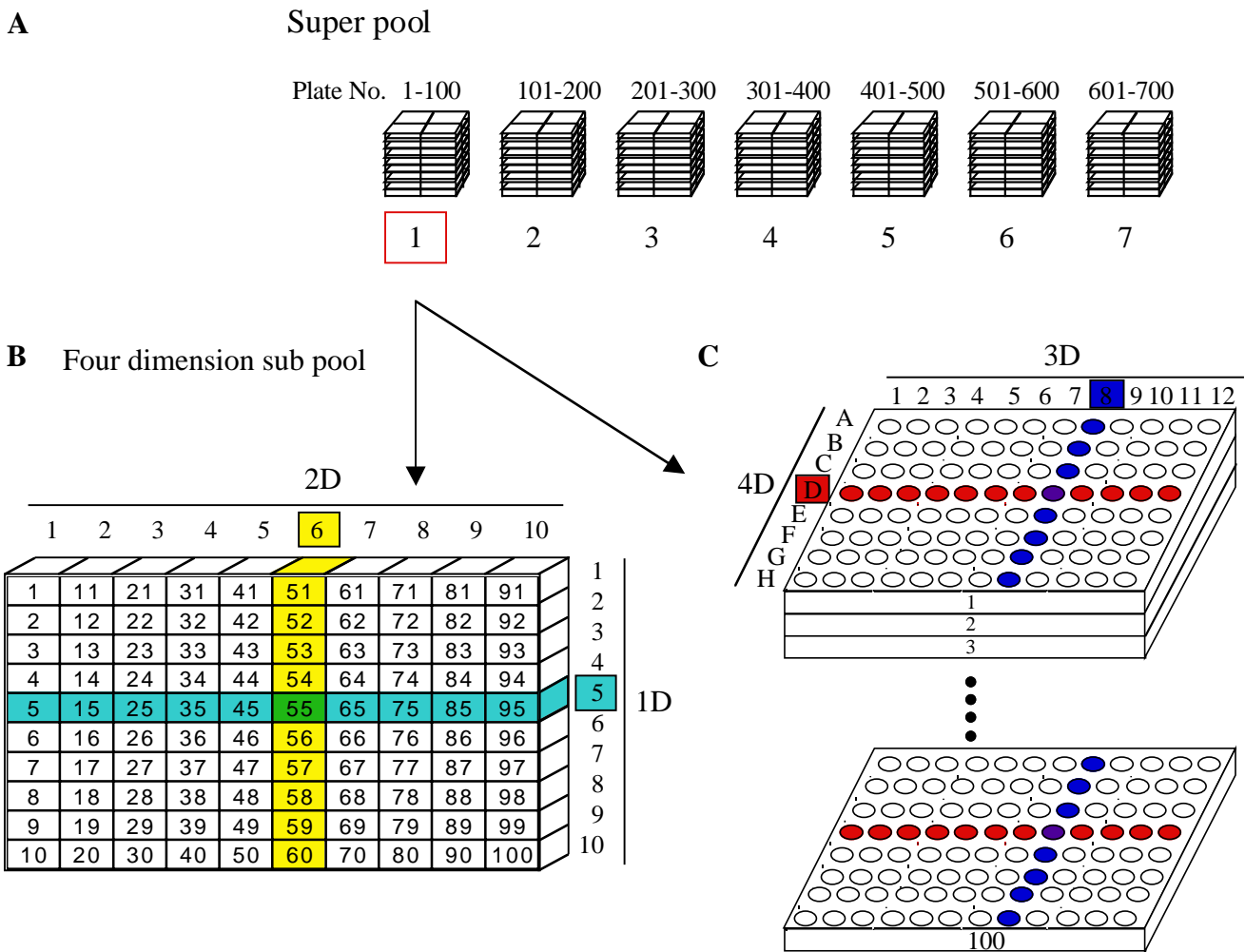


図10 4次元PCR法によるBACクローンのスクリーニングの戦略。A、1つのスーパープールには96穴プレート100枚分のBACクローンを集めてある。B、4次元PCRの1と2次元めのプール。枠内の数字はプレートNo.を示す。枠外の数字はプールNo.を示す。C、4次元プールの3と4次元めのプール。100枚のプレートの列ごとにBACクローンを集めたものを3次元め、行ごとに集めたものを4次元めとした。Asakawa et al.の図を改変 (Asakawa et al., 1997)。

実際のスクリーニングは、1回目のPCR反応はSuper poolの7点について行い、目的とするBACクローンの存在が確認されたSuper pool (図の例ではSuper pool No.1) について、2回目のPCR反応 (1D+2D+3D+4D = 10+10+12+8 = 40点) を行い、目的のクローンを特定した (図の例では、各次元プール中の陽性プール情報から、目的のクローンの存在位置がNo.55のプレートの8Dウェルと一義的に特定される)。

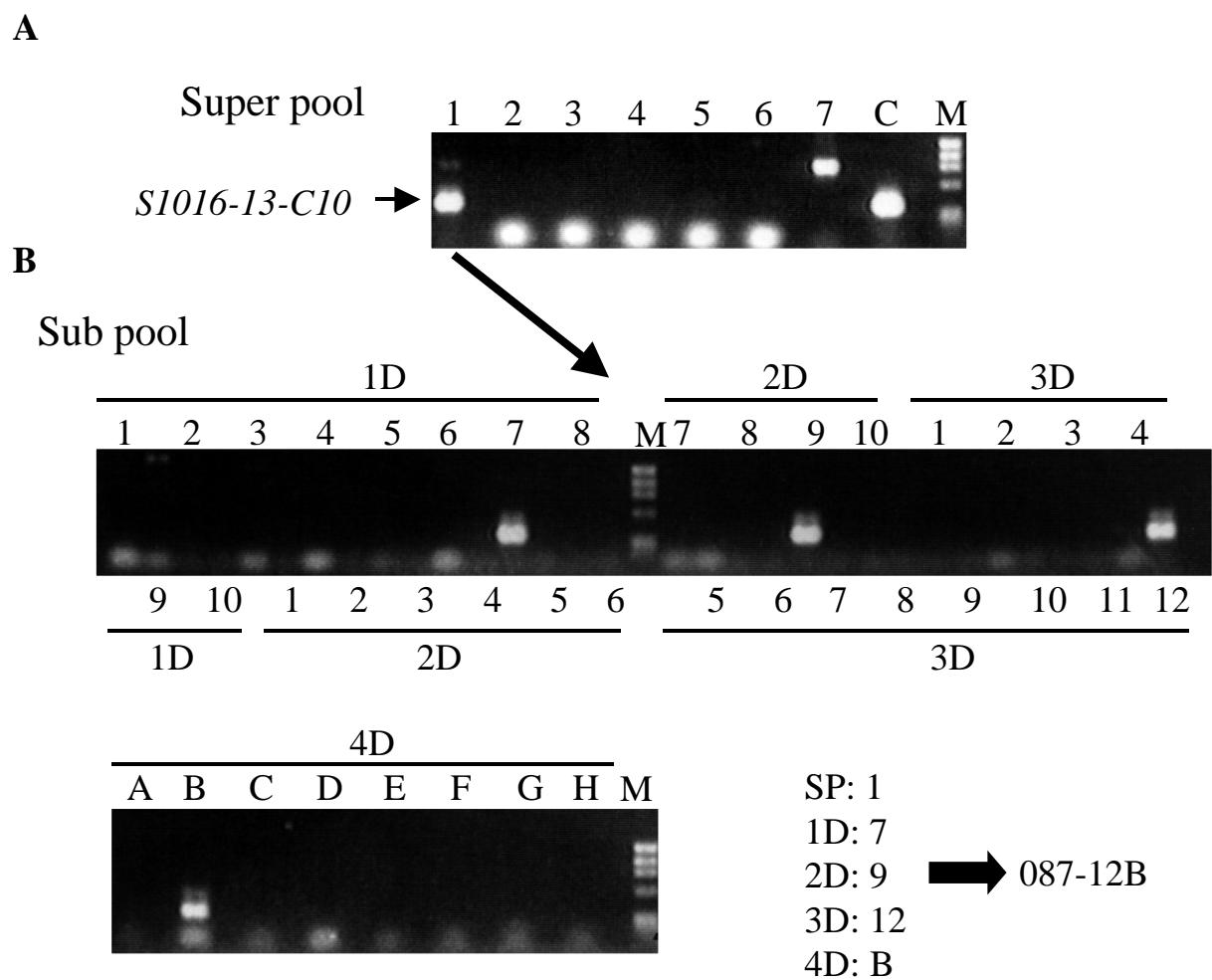


図11 4次元PCR法によるBACクローンのスクリーニングの例。A、スーパープールの1次スクリーニング。B、4次元PCRによる2次スクリーニング。

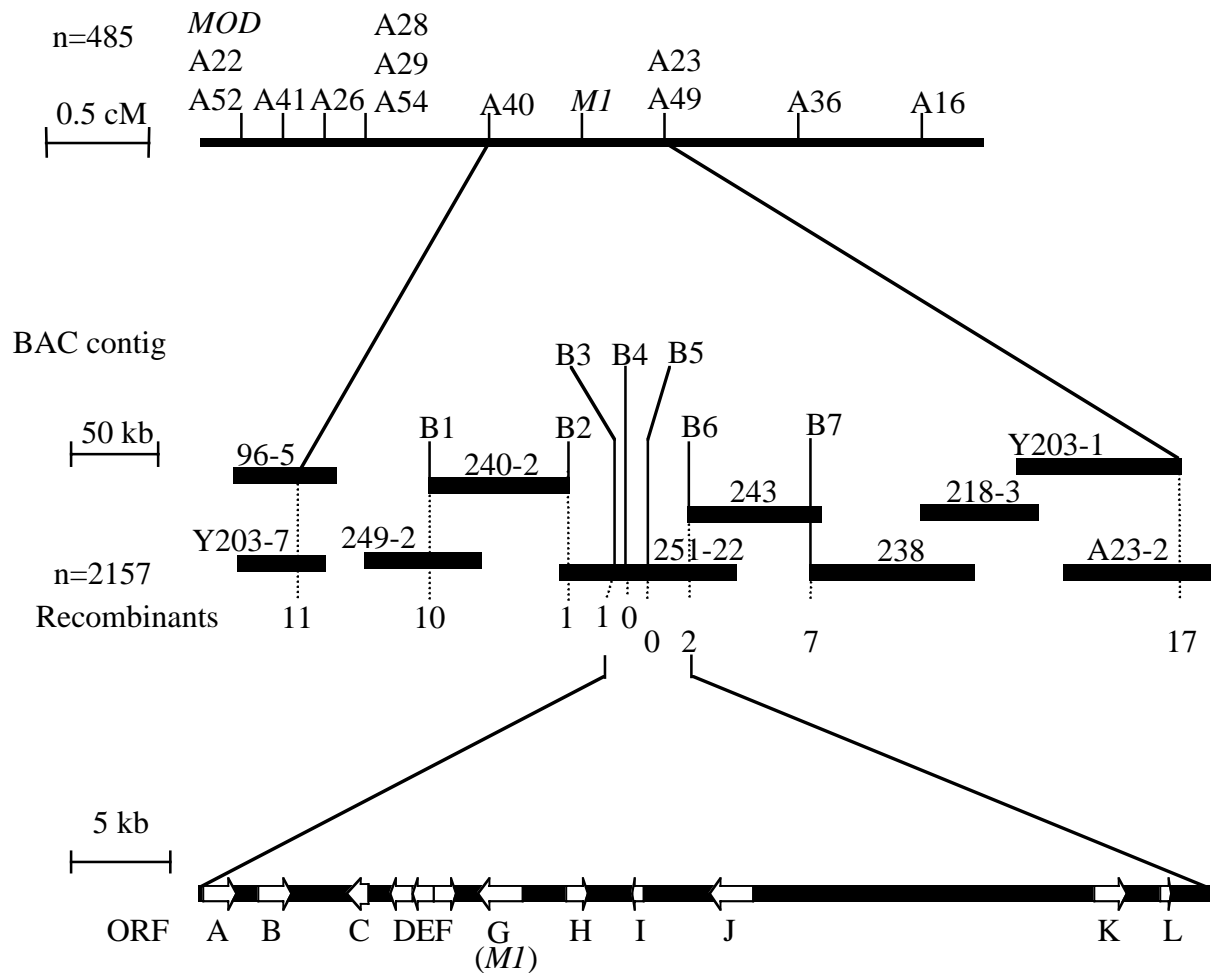


図12 *MI*遺伝子座の物理地図。A16-A54はAFLPマーカー（図9参照）。B1-B7はシーケンスマーカー。マーカーの下の数字は組みかえの起こった植物体の数を示す。データベースから予測される遺伝子の特徴；A、glutathione *S*-transferase；B、serine/threonine protein phosphatase PP1；C、D、E、F、tropinone reductase；G、protein kinase；H、hypothetical protein；I、retroelement *pol* polyprotein；J、RING finger protein；K、*Ac*-like transposase；L、histone H4。

表4 BACクローンのリスト。

Name	Adress	Syntenic region		Size (kbp)
		M13F side	M13R side	
Y96-5	345-1B	C2. S250. 38K*	-	60
Y203-1	108-1C	C2. S151. 78K	-	90
Y203-7	671-12D	-	C2. S252. 76K	50
A23-2	456-5C	C2. S151. 46K	-	80
218-3	313-6A	C2. S155. 4K	C2. S157. 60K	65
238	97-12E	C2. S155. 33K	C2. S161. 5K	90
243	248-4A	C2. S161. 3K	C2. S163. 13K	70
240-2	636-1D	-	-	70
249-2	313-7F	-	-	60
251-22	507-3H	-	C2.S162.10K	100

*C2は*Arabidopsis thaliana*の第2染色体を、S250はセクション250を、38Kは38 kbpの領域とシンテニーがあることを意味している。*A. thaliana*の第2染色体はBACを主とする255個の断片（セクション1-255）からなる物理地図が作製されており、各塩基配列がデータベースに登録されている。

ころ、*M1* 遺伝子はマーカー-B2 と B6 の間にマップされ、BAC251-22 上にあることが明らかになった (図 12)。そこで BAC251-22 の塩基配列を決めることとし、1,440 のショットガンシーケンスとプライマーウオーキングにより 103 kbp の塩基配列を完成し、その塩基配列を元にマーカーを作製した。最終的に *M1* 遺伝子はマーカー-B3 と B6 の約 50 kbp の領域まで絞り込むことができた (図 12)。

M1 遺伝子のクローニング

M1 遺伝子座の 50kbp の領域について BLASTX プログラムでデータベースと比較したところ 12 個 の ORF が予測された (図 12)。これまでに明らかにされた自家不和合性に関わる柱頭側の因子は柱頭で特異的に発現していることから、柱頭特異的に発現している遺伝子は *M1* 遺伝子の有力候補となる。各予想 ORF の mRNA の発現部位を調べるために柱頭、葯、茎、および葉について RNA を抽出し、12 の候補 ORF について RT-PCR を行った (図 13)。その結果 ORF1 が柱頭で特異的に発現していると予想され、また情報伝達に関わるタンパク質であるプロテインキナーゼをコードしていると予測されたことから *MLPK* (*M locus protein kinase*) と命名し、*M1* 遺伝子の候補として解析を進めることにした。*MLPK* 遺伝子のゲノム配列から遺伝子予測プログラムである FGENESH_GC (<http://mendel.cs.rhul.ac.uk/mendel.php?topic=fgen>) および GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) を用いて、構造の予測を行い、RT-PCR により、*MLPK* 遺伝子の全長の配列を決定した。両プログラムは同じアミノ酸配列を予測し、RT-PCR によって得られた cDNA のコードするアミノ酸配列と一致していた。cDNA の配列はプログラムによって予測された翻訳開始地点の ATG から 48 bp 上流にストップコドンが入っており、そのストップコドンから下流の初めのメチオニンであったため、これが翻訳開始地点と予想された。以上のことから *MLPK* 遺伝子は 404 アミノ酸のプロテインキナーゼをコードしていると予測された (図 14)。

MLPK 遺伝子の発現パターンを正確に調べるためにノーザンブロットングによる解析を行った (図 15)。*MLPK* mRNA は調べた組織の中では柱頭で特に強く発現しており、花の発達ステージごとに分けてみると未成熟な柱頭では発現がほとんどなく、開花数日前から発現が上昇し始め、開花当日に最も強い発現がみられた。このような発現パターンは柱頭の自家不和合性の獲得時期や *SRK* のパターンと似ている (Stein *et al.*, 1991)。

もし *MLPK* が *M1* 遺伝子であるならば *m1m1* 個体ではその機能を失っているはずである。そこで *m1m1* 植物の *MLPK* 遺伝子のゲノム領域を PCR によって増幅し、アミノ酸のコード領域を比較した。*m1m1* の *MLPK* 遺伝子のコード領域には *MIMI* と比べて、1 塩基の非同義置換が存在し、また、アミノ酸のコード領域ではないが、予

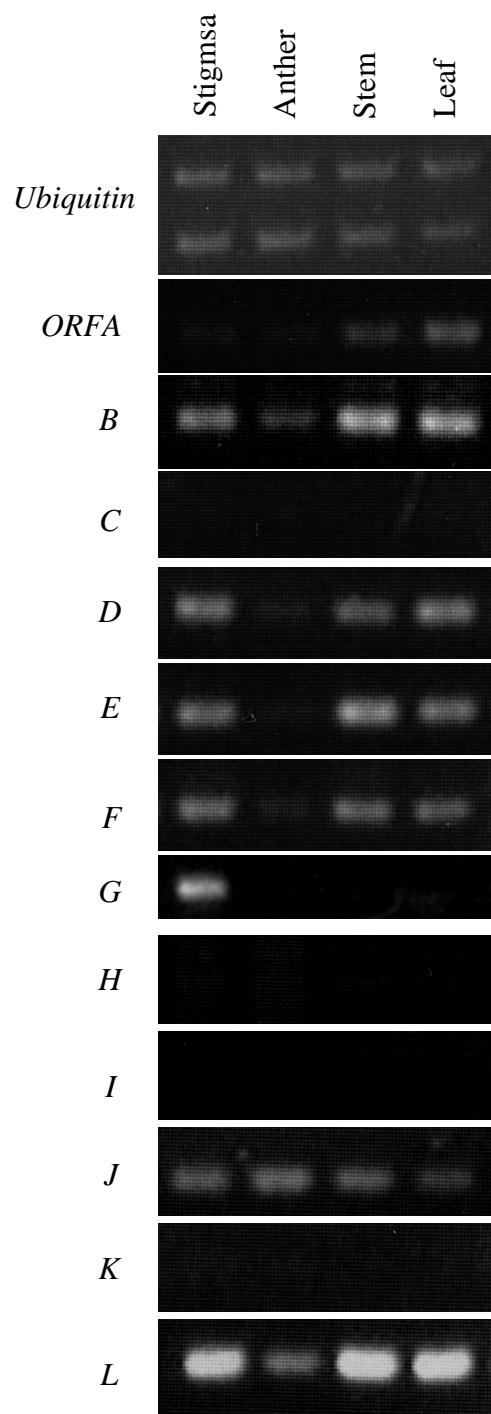


図13 *MI*遺伝子座周辺領域に存在する予測ORFのRT-PCR法による発現解析。

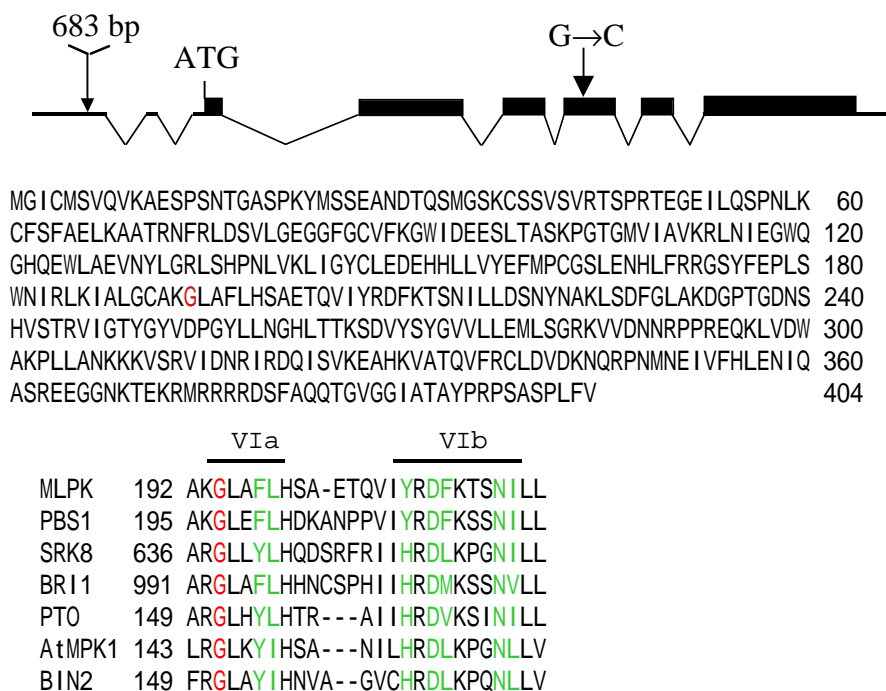


図14 *MLPK*の遺伝子構造と*MLPK*蛋白質の予測アミノ酸配列。上段は*MLPK*のゲノム構造を示す。太実線はエキソン、それらを結ぶ折れ線はイントロンを示す。黒ボックスは蛋白質コード領域。矢印は*m1*変異体において見出されたインサージョン（683 bp）の位置と1塩基非同義置換（G→C）の位置を示す。この1塩基置換により、変異型*MLPK*では、194残基目のGly残基（赤字で示した）がArg残基に置換している（中段）。植物由来キナーゼ類とのドメインVI領域のアミノ酸配列比較（下段）。赤字は、*m1*個体由来*MLPK*で変異が認められたGly残基を、緑字は、ドメイン内で保存された他のアミノ酸残基を示す。GenBank Accession Nos.: *MLPK*, AB121973; *PBS1*, AF314176; *SRK8*, D38563; *BRI1*, AF017056; *PTO*, A49332; *AtMPK1*, D14713; *BIN2*, AY157149.

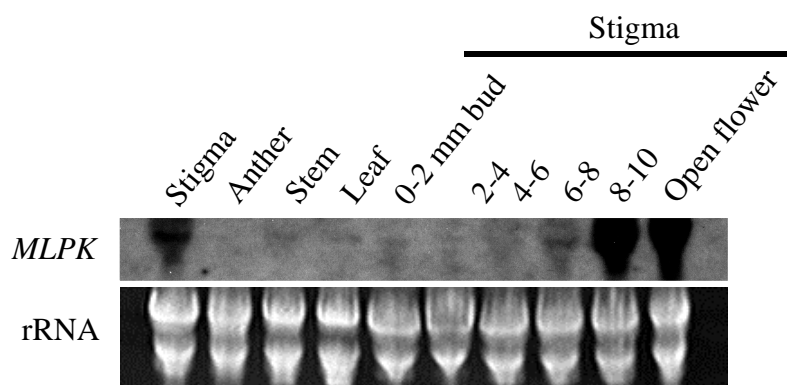


図15 *MLPK*のノーザンプロット解析。各組織から抽出したトータルRNA（各20 μg）を分離後、全長*MLPK* cDNAをプローブとして用い検出した。Stigmaの下の数値は、各柱頭を採集した時期の蕾の生育段階（蕾の長軸長mm）を示す。左端のStigmaおよびAntherでは、これらの生育段階の組織を合わせてRNAを抽出した。

想翻訳開始点より上流の第 1 エキソンに 683bp のインサージョンがあった (図 14)。コード領域における 1 塩基の非同義置換は MLPK の 194 番目のグリシンをアルギニンに変えていた。このグリシン残基はプロテインキナーゼにおいて保存されている 11 のドメインの中のドメイン VIa に属し、高く保存されているアミノ酸であったため、このアミノ酸の置換がキナーゼ活性に影響を及ぼすことが予測された。この点を検証するために野生型および G194R 型 (MLPK^{G194R}) の MLPK を GST (glutathione S-transferase) 融合タンパク質として大腸菌内に発現させ、得られた発現タンパク質の *in vitro* における自己リン酸化活性を測定した (図 16)。その結果、野生型の MLPK 融合タンパク質は自己リン酸化活性を示し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 由来の ³²P によりタンパク質が標識されることが確認されたが、MLPK^{G194R} 融合タンパク質では自己リン酸化活性が検出されず、キナーゼとしての活性を失っていると予想された。また、*m1* 変異体の MLPK 遺伝子は第 1 エキソンに 683 bp のインサージョンを持つため、MLPK の発現、プロセッシング、翻訳等に影響が及ぶ可能性が考えられたが、ノーザンブロットによる解析では *m1m1* 株においてもほぼ同じサイズに MLPK の mRNA は検出され、その発現量は *MIMI* 株に比べて減少していた (図 17)。またタンパク質レベルでの比較をするために、発現 MLPK タンパク質に対して作製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。まず、用いた MLPK 抗体の反応性を調べるために、GST 融合タンパク質の MLPK と MLPK^{G194R} を大腸菌で発現させ、菌体の抽出物に対してウエスタンブロット解析を行った。本抗体は IPTG 処理による発現誘導後の大腸菌体中の MLPK と MLPK^{G194R} タンパク質と特異的に反応することが示された。また MLPK と MLPK^{G194R} ではほぼ同じ程度のバンド強度を示したので、本抗体は両者共に認識できることが示唆された (図 18)。ところが本抗体を用いたウエスタンブロット解析により柱頭抽出物中の MLPK タンパク質の検出を試みたところ、*MIMI* 個体の柱頭抽出物中には予測される MLPK タンパク質の分子量にバンドが確認されたのに対して、*m1m1* 個体の柱頭抽出物中では MLPK は検出されなかった (図 19)。この結果は *m1m1* 個体の柱頭中には MLPK^{G194R} タンパク質が翻訳されていないか安定な形で維持されていないことを示唆している。いずれにしても、MLPK^{G194R} タンパク質がキナーゼ活性を失っていることと、同タンパク質が柱頭抽出物中に検出されないことは、MLPK が *m1m1* 遺伝子型の柱頭中では機能していないことを強く示唆している。

相補試験

MLPK が *MI* 遺伝子本体であることを確かめるために相補試験を行った。*B. rapa* は一般に形質転換体の作出が難しく、一部の系統での成功例しか報告がないため (Takasaki *et al.*, 1997)、新たに一過的な遺伝子発現系による相補試験法の確立を試み

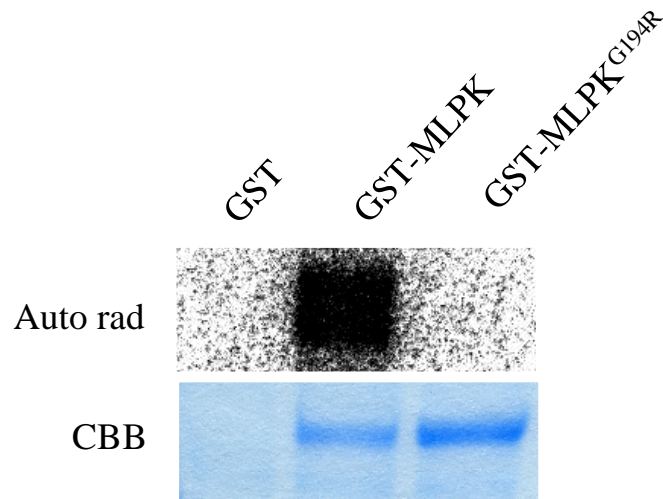


図16 発現GST融合MLPKタンパク質の*in vitro*リン酸化活性。上段は、発現蛋白質中への³²Pの取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。下段は、クーマシーブリリアントブルー（CBB）染色像。

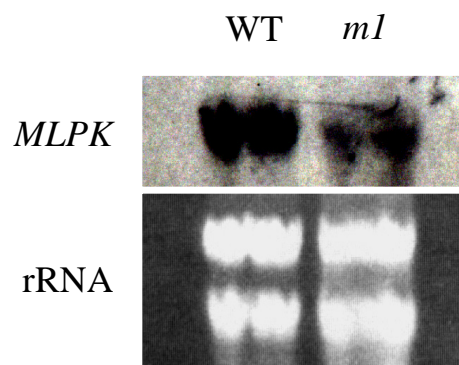


図17 *ml*変異体におけるMLPKのノーザンブロット解析。*S₈S₈M1M1*および*S₈S₈m1m1*の柱頭から抽出したトータルRNA（10 μg）に対し、全長MLPK cDNAをプローブとして検出した。

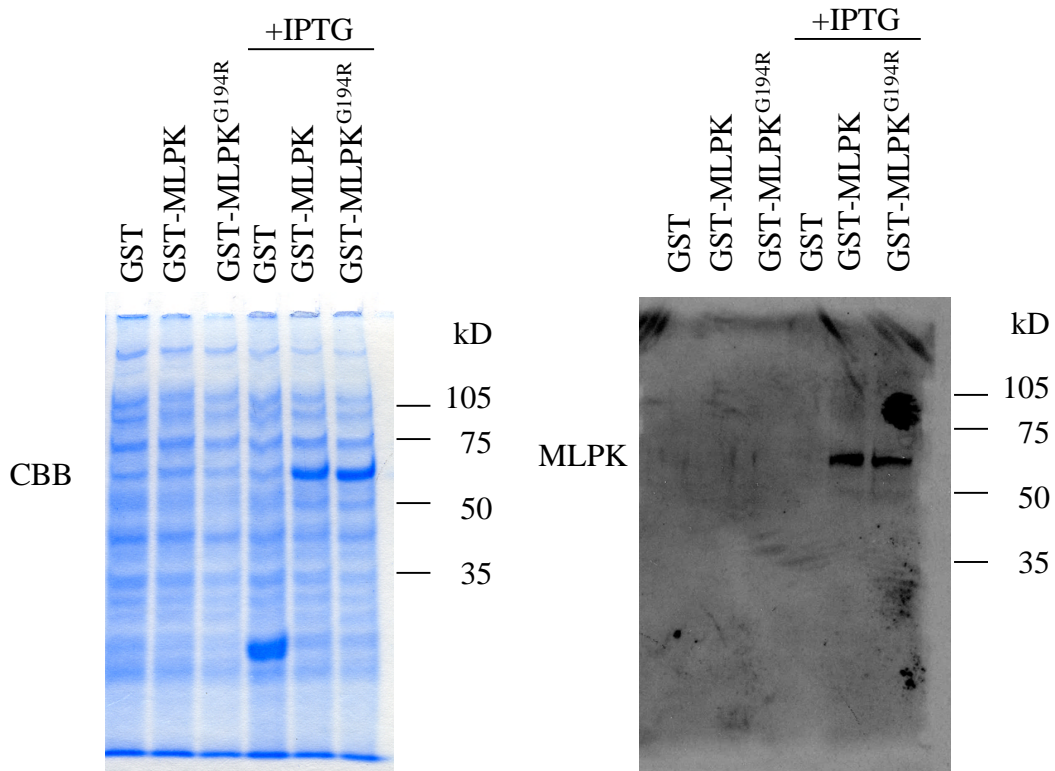


図18 発現MLPK融合タンパク質のウエスタンブロット解析。GST、GST-MLPK、GST-MLPK^{G194R}の各コンストラクトを形質転換した大腸菌をIPTGによる発現誘導前、誘導後に回収し、菌体の破碎液を流した。左はクマシーブリリアントブルー染色（3 μ gタンパク質/レーン）、右はMLPK抗体によるウエスタンブロットティング（0.3 ng/レーン）。

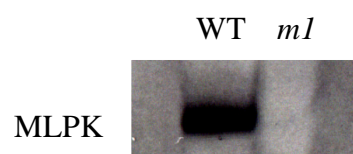


図19 *ml*変異体におけるMLPKタンパク質の発現。*S₈S₈M1M1*および*S₈S₈mlml*の柱頭をSDSサンプルバッファーで抽出し、SDS-PAGEにて分離（5花相当量/レーン）、ブロットティング後、MLPK抗体を用いて検出した。

た(図 20)。RFP と MLPK 遺伝子をパーティクルガン法により S_8S_8m1m1 もしくは S_9S_9m1m1 遺伝子型の柱頭に導入し、蛍光顕微鏡で RFP が発現している細胞を探し、マイクロマニピュレーターで花粉を乗せ、花粉管の乳頭細胞への進入の観察をした。コントロール実験として RFP のみを導入した乳頭細胞は不和合および和合花粉ともに約 60% の花粉の進入が観察された(表 5、図 21)。一方、RFP とともに MLPK を導入した S_8S_8m1m1 遺伝子型の乳頭細胞では和合花粉ではコントロールと同様に花粉の進入がみられたが、不和合花粉では 30% 程度の花粉管の進入しか起こらなかった(表 5、図 21)。また、 S_9S_9m1m1 遺伝子型の乳頭細胞に MLPK を発現させた時も同様に、不和合花粉が特異的に拒絶された(表 5)。以上の結果は $m1m1$ 遺伝子型の乳頭細胞に MLPK を導入することで自家不和合性が回復することを示すものであり、MLPK が MI 遺伝子の本体であることを強く示唆している。

考察

本章では、MI 遺伝子のポジショナルクローニングをするために、BAC クローンの簡易スクリーニング系の構築と物理地図の作製、MI 遺伝子座の絞り込み、MI 遺伝子の座乗する BAC クローンの塩基配列決定を行い、プロテインキナーゼをコードする MLPK を有力候補として見出した。さらに、MLPK が自家不和合性反応の起こる柱頭で特異的に発現していること、 $m1m1$ 株の持つ MLPK^{G194R} はキナーゼ活性を失っていることと同時にタンパク質レベルでの発現が確認できないことを示した。さらに、MLPK を一過的に発現させた $m1m1$ 株の乳頭細胞が自家不和合性を回復することを示し、MLPK が MI 遺伝子であると結論づけた。

本章で用いた 4 次元 PCR による BAC のスクリーニング法は、これまでに報告された BAC のスクリーニング法の中で最も有用な方法の 1 つである(Asakawa *et al.*, 1997)。今回構築した BAC ライブラリーのプールを用いればわずか 2 回の PCR で陽性のクローンを特定できるため、1 日でスクリーニングが終了する。従来の高密度メンブレンに BAC クローンをスポットする方法では目的のクローンを選抜するためにハイブリダイゼーションの操作が必要であり、2 日以上を要する。さらに高密度メンブレンの作製自体に大掛かりの装置と時間を要する。今回作製した PCR のテンプレートは約 1 万回のスクリーニングに耐えうる量があるため、今後の BAC クローンのスクリーニングに新たに高密度メンブレンを作製するような面倒な作業の必要がなくなることも利点である。ハイブリダイゼーション法では相同性が高い塩基配列を含むクローンが擬陽性シグナルを与えることが多いが、本研究で用いた 4 次元 PCR 法によるスクリーニングでは擬陽性クローンはほとんど検出されなかった。一方で、このスクリーニング法では 1 つのスーパープールの中に 2 つ以上の陽性のクローンが含まれる場合にクローンの同定が煩雑になることが懸念された。すなわち、2 つの

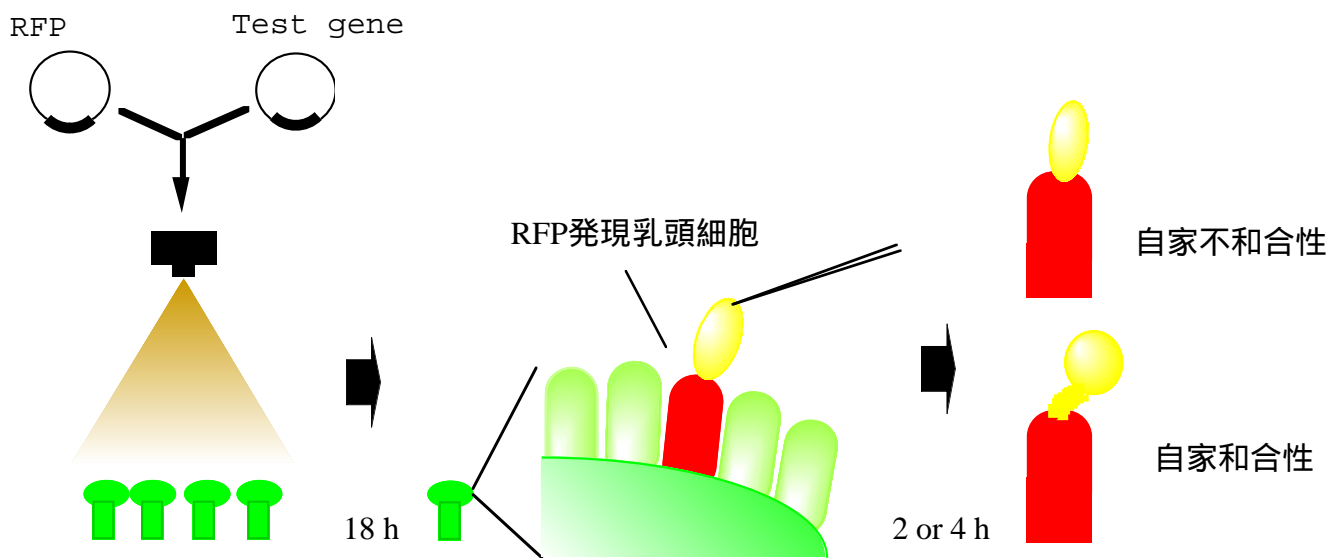


図20 柱頭におけるMLPKの一過的発現試験法の手順。

表5 *m1*変異株におけるMLPK導入の効果。

Stigma	Transgene	Pollen	Number of penetrated pollen/tests (%)
<i>S₈S₈m1m1</i>	<i>RFP</i>	Self	28/48 (58)
		Cross	32/49 (65)
	<i>RFP+MLPK</i>	Self	14/45 (31)*
		Cross	32/48 (67)
<i>S₉S₉m1m1</i>	<i>RFP</i>	Self	32/50 (65)
		Cross	31/48 (65)
	<i>RFP+MLPK</i>	Self	1/39 (3)*
		Cross	27/47 (57)

*Self-pollinated co-introduced *RFP* and *MLPK* (experimental) vs. self-pollinated with only *RFP* introduced (control): *S₈S₈m1m1*, $\chi^2 = 6.95$, $P < 0.01$; *S₉S₉m1m1*, $\chi^2 = 35.4$, $P < 0.001$.



図21 *MLPK*を一過的に発現させた S_8S_8m1m1 植物体の典型的な表現型。左は明視野、右はRFPの蛍光の画像。矢印は乳頭細胞内に侵入している花粉管を示す。

陽性クローンが含まれるとあると 16 クローンまで、また 3 つの陽性クローンが含まれると 64 クローンまでしか絞れない計算となり、更なる PCR 反応の必要性が予想された。しかしながら、3 つのクローンが 1 つのスーパープールに含まれるようなケースはまれで、実際のスクリーニングではほとんど問題にならなかった。今回の BAC コンティグの作製では BAC Y203-7 に隣接するクローンを同定することはできなかったが、高密度メンブレンを用いたハイブリダイゼーション法でも検出されなかったことから、用いたライブラリー中に該当するクローンが存在しなかった可能性が高い。残りのスクリーニングではすべて目的のクローンを得ることが出来たことから、本 4 次元 PCR 法によるスクリーニングの有用性が示されたと思う。

マーカーと A23 の間 0.8 cM を BAC クローンによるコンティグでつなぎ、物理地図を作製した。その距離はおおよそ 500 kbp であり、BAC Y203-7 と 249-2 の間にわずかにつながっていない領域があるが、組みかえを調べた 2,153 染色体の中で組みかえが起こっていた個体は 1 個体だけであったことから、ほとんど距離はないと思われる。2,153 染色体の組みかえ頻度の解析から、*M1* 遺伝子座周辺の物理距離と遺伝距離の関係は 625 kbp/cM と算出され、この結果は *Brassica* ですでに報告されている 500-700 kbp/cM の値と矛盾しない結果となった (Casselman *et al.*, 2000; Sadowski *et al.*, 1996)。

m1 変異体の MLPK はフレーム内の塩基置換によりプロテインキナーゼの 11 の保存領域の 1 つである VIa の比較的高く保存されたグリシンをアルギニンに置換しており、MLPK 発現タンパク質の自己リン酸化活性を失わせていた。MLPK mRNA の発現は *m1* 変異体でもあったが、タンパク質が検出はされなかったことはこの 1 塩基置換により転写後の何らかの調節を受けてタンパク質の翻訳が抑えられているか、合成されたタンパク質が速やかに分解されていることを示唆している。1 塩基の非同義置換によるタンパク質の消失はいくつかのタンパク質で観察されている (Moore *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2002)。例えば、マウスの神経細胞でチューブリンのメンテナンスをしている Tbce (tublin-specific chaperone e) タンパク質はパルスチェイス実験により、1 塩基置換したタンパク質の安定性が減少することが示されている (Martin *et al.*, 2002)。MLPK のタンパク質が *m1* 変異体では消失していることはタンパク質の安定性が損なわれることで分解されている可能性が高いと思われる。

一般に変異体の原因遺伝子の特定には形質転換実験による相補試験が行われているが、アブラナ科植物では一般に利用されている *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換体の作出は難しく、とくに *B. rapa* では F₁ ハイブリッドの栽培種であるおそめでの形質転換は成功しているが (Shiba *et al.*, 1995; Takasaki *et al.*, 1997) それ以外の系統での成功例はほとんど報告されていない。最近になって一過的な発現系を用いたアッセイが認められるようになり、*A. tumefaciens* を用いた形質転換の困難な植物

での代替の方法として、また迅速に遺伝子導入の効果を調べるための手段として用いられている。形質転換の難しい大麦ではパーティクルガンを用いた試験法が利用されており (Schweizer *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002)。例えば *RAR1* および *SGT1* 遺伝子の RNAi コンストラクトを葉に撃ち込み、形質転換された細胞に病原菌が進入できるかを観察している (Azevedo *et al.*, 2002)。また、同じく形質転換の難しいシダ植物においてもフィトクローム遺伝子の変異体にパーティクルガンを用いて *PHY3* 遺伝子を発現させ、発現した細胞の葉緑体の光応答性を観察することによって 1 細胞レベルでの相補試験が行われている (Kawai *et al.*, 2003)。アブラナの自家不和合性反応も花粉と乳頭細胞の 1 細胞間の現象であること、乳頭細胞は柱頭の表層の細胞であることを考えると、パーティクルガンを用いるアプローチは形質の変化を観察するために必要な条件を満たしており、今回の実験で *m1* 変異を *MLPK* が相補できたことは自家不和合性の研究にこの試験法が有用であることを示している。

第3章 MLPKの生化学的、分子生物学的解析

序

第2章において *MI* 遺伝子の本体がプロテインキナーゼをコードする *MLPK* であることが明らかになった。*MI* 遺伝子産物は SRK シグナル伝達の下流で重要な働きをしていると考えられてきたため、MLPK は SRK のリン酸化カスケードの1員として機能していると予想される。ここでは MLPK の自家不和合性情報伝達における役割を明らかにすることを目的に、主に生化学的および分子生物学的解析によって *MLPK* の特徴づけを行った。

材料と方法

サザンブロッティング

野生型 *B. rapa* S₈ ホモ個体の葉から Plant DNA_{ZOL} Reagent(Invitrogen)を用いて DNA を抽出し、*Hind*III、*Pst*I、*Xba*I、および *Eco*RV (各 5 μg) により切断し、0.7%のアガロースゲルで分離した後、Hybond-N+メンブレンにプロットした。プローブには全長の *MLPK* cDNA を用いた。プローブのアルカリフォスファターゼラベルとハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct のプロトコルに従って行った。

リン酸化アミノ酸分析

GST-MLPK 発現タンパク質は2章と同様にして[γ-³²P]ATP存在下で自己リン酸化し、十倍量のアセトンを加えて沈殿させた後、50 μl の 6 M HCl を加え、100 °C で 30 分反応させ、TLC plate cellulose (Merck) にスポットし、2次元電気泳動に供した。コントロールとして 1 mg/ml のホスホセリン、ホスホスレオニン、ホスホチロシン (SIGMA) を同様にスポットした。1次元目の電気泳動は pH 1.9 バッファー (2.2% ギ酸、7.8% 氷酢酸、pH 1.9) で 1,500V、20分、2次元目は pH 3.5 バッファー (5% 氷酢酸、0.5% ピリジン、pH 3.5) で 1,300V、13分泳動した。泳動には Multiphor II (Amersham Biosciences) を用いた。リン酸化アミノ酸の検出は TLC プレートにイメージングプレートに感光させ、BAS-2500 IP Reader で読みとり、解析した。コントロールのリン酸化アミノ酸は TLC プレートにニンヒドリン (SIGMA) をスプレーし、65 °C で 15 分間加熱して検出した。

in vitro 転写翻訳実験

MLPK および Gly2 を Ala に置換した MLPK^{G2A} はそれぞれプライマー MF1-F (5'-ATGGGGATTTGCATGAGTGT-3')、ECOMAR (5'-TTGAATTCTCAGACAAACAGAGGCGAAGC) および MG2A-F (5'-

ATGGCTATTTGCATGAGTGT-3')、ECOMAR の組み合わせで KOD -Plus- (TOYOBO) を用いて PCR 増幅し、T4 Polynucleotide kinase によって末端をリン酸化した後、*Sma*I で切断し、CIAP 処理した *In vitro* 転写用ベクター-pCMVTnT (プロメガ) に入れた。各コンストラクトは *Bam*HI で切断し、1 本鎖にした後 Thermo T7 RNA Polymerase (TOYOBO) を用いて *in vitro* 転写を行った。*In vitro* タンパク質合成は PROTEIOS Wheat germ cell-free protein synthesis core kit (TOYOBO) を用いて行った。反応はプロトコルに従って行い、各 1 μ g の RNA を反応液に加え、コントロールでは水を加えた。全タンパク質の検出には 15 μ Ci の L-[³⁵S]Methionine (Amersham Biosciences) を、ミリスチル化の検出には 50 μ Ci の [9, 10 (n)-³H]Myristic acid (Amersham Biosciences) を反応液に加えた。タンパク質は SDS-PAGE によって分離し、乾燥した後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500 IP Reader で検出した。

タバコプロトプラストでの一過的発現

GFP のコンストラクトは理化学研究所宮脇敦博士より供与された。GFP は *Sma*VenusF (5'-CCCGGGACCATGGTGAGCAAG-3') と *Sac*VenusR (5'-GAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTC-3') のプライマーセットで PCR 増幅し、pGEM T-Easy にクローニングし、*Sma*I、*Sac*I で切り出した後、植物発現用ベクター-pBI221 の *Sma*I/*Sac*I 部位に挿入し、pGFP とした。MLPK の GFP 融合タンパク質は MLPK の C 末端側に GFP を結合させる形で作製した。MLPK はプライマー-*Sma*MyMKF (5'-CCCGGGATGGGGATTTGCATGAGT-3') と *Bam*MyMKR (5'-GGATCCGACAAACAGAGGCGAAGC-3')、GFP はプライマー-*Bam*VenusF (5'-GGATCCACCATGGTGAGCAAG-3') と *Sac*VenusR を用いて PCR 増幅し、pGEM T-Easy にクローニングした。それぞれのプラスミドを *Sma*I、*Bam*HI および *Bam*HI、*Sac*I で切断し、pBI221 の *Sma*I/*Sac*I 部位に挿入した。MLPK^{G2A} はプライマー-MG2AF (5'-ATGGCTATTTGCATGAGTGT-3') と *Bam*MyMKR で KOD-plus-を用いて PCR 増幅し、T4 Polynucleotide kinase によって末端をリン酸化した後 pGFP の *Sma*I 部位に挿入した。タバコの BY-2 細胞は本学加藤晃博士よりいただいた。タバコ培養細胞は酵素溶液 [4% cellulase Onozuka RS (Yakult)、1.5% macerozyme (Yakult)、0.3% pectolyase Y-23 (Kikkoman)、0.4 M mannitol、8 mM CaCl₂、5 mM Mes-KOH、pH 5.8] 中で 2 時間、室温で穏やかに振とうし、プロトプラストにした。プロトプラストは 100 g で 5 分遠心して回収し、洗浄液 (0.4 M mannitol、70 mM CaCl₂、5 mM Mes-KOH、pH 5.8) で 2 回洗浄した。PEG を用いた遺伝子の導入は Abel and Theologis の方法に従って行った (Abel and Theologis, 1994)。プロトプラストは W5 溶液 (154 mM NaCl、125 mM CaCl₂、5 mM KCl、5 mM グルコース、1.5 mM Mes-KOH、pH 5.8) に懸濁し、氷上に 30 分置いた後、MaMg 溶液 (400 mM マンニトール、15 mM MgCl₂、5 mM Mes-KOH、pH 5.8)

に細胞密度が 5×10^6 /ml となるよう懸濁した。300 μ l のプロトプラスト溶液に 30 μ g のプラスミドと 50 μ g の Salmon testes DNA (Sigma) を加え、等量の PEG-CMS 溶液 (400 mM マンニトール、100 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、40% PEG) を加えて混ぜ合わせた後、氷上に置いた。30 分後 20 倍量の W5 溶液を徐々に加えて希釈し、60 g で 5 分遠心した後 W5 溶液で一度洗浄し、プロトプラスト培養液 (1 \times Murashige and Skoog Plant Salt Mixture、1 \times Gamborg B5 ビタミン、3%スクロース、400 mM マンニトール) に移し、暗黒下で 22 $^{\circ}\text{C}$ 、1 晩培養した。GFP の発現した細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

柱頭抽出物の分画

柱頭における MLPK の細胞膜局在の確認は aqueous two-phase partitioning で行った。 S_9 ホモ個体の柱頭 1,000 個に 1 ml の 20 mM MES (pH 5.8) とプロテアーゼ阻害剤 (Complete) を加えてペッスルですりつぶし、5,000 g、15 分遠心した。上清を 100,000 g、60 分遠心し、その上清を細胞質画分とし、ペレットは 300 μ l の SPK バッファー (0.33 M スクロース、3 mM KCl、5 mM リン酸カリウム、pH 7.8) に懸濁してミクロソーム画分とした。Two-phase partitioning は Larsson *et al.* の方法に従って行った (Larsson *et al.*, 1987)。終濃度が 6.2% (w/w) Dextran T500、6.2% (w/w) PEG、0.33 M スクロース、3 mM KCl、5 mM リン酸カリウム、pH 7.8 になるように試薬を混ぜ合わせ、2 相系を作製した。この 2 相系で分配を行うと上層に細胞膜が濃縮される。ミクロソーム画分 270 μ l に同じ組成になるように試薬を加えて 2 相系を作製し、30 回転倒混和させたのち、1,500 g で 5 分遠心し、2 層に分けた。上層を新しいチューブに移し、下層を加えて更に 2 回分配を行った。はじめの下層に新しい上層を等量加え、同様に分配し、計 3 回分の上層を集めた。これに等量の 20 mM MES (pH 5.8) を加え、100,000 g で 60 分遠心し、ペレットを細胞膜画分とした。タンパク質量はプロテインアッセイキット I (Bio-Rad) を用いて測定した。

Race PCR および RT-PCR

完全長 cDNA を得るための RacePCR を行った。3'-Race PCR は 2 章の方法と同様にして 1 本鎖 cDNA を合成し、プライマー-STKF1 (5'-GGTCATCAAGAATGGCTGG-3') および EcoNotT (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGCATTTTTTTTTTTTTTTT-3') を用いて行った。5'-Race PCR は GeneRacer Kit (Invitrogen) およびプライマー-M5Race1 (5'-TGTCTAGTCTGAAATTCCTA-3')、M5Race3 (5'-TTGCAAGATCTCTCCTTCGG-3') を用いて行った。得られたバンドは pGEM T-Easy ベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。

MLPK の 2 種類の転写産物の RT-PCR は 2 章と同様の方法で行った。用いたプライ

マーはコントロールのコピキチンを増やす ubiF、ubiR、および *MLPK* の 2 つのフォームを特異的に増やすプライマー、*MLPK* フォーム 1 が MF1F (5'-ATGGGGATTTGCATGAGTGT-3') と Race6 (5'-TTCATCCTCTAAGCAGTAACCGAT-3')、*MLPK* フォーム 2 が MF2F (5'-ATGGGTTTTGTGAAAAAAGTG-3') と Race6 である。50 ng の total RNA 相当量の cDNA をテンプレートにコピキチンは 21 サイクル、*MLPK* フォーム 1 は 28 サイクル、*MLPK* フォーム 2 は 25 サイクル PCR 増幅した。

cDNA のスクリーニング

MLPK の cDNA を得るために cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。 S_{36} 柱頭 cDNA ファージライブラリー (Lambda ZapII、Stratagene) は岩手大学渡辺正夫 助教授からいただいた。ファージライブラリーはブランクハイブリダイゼーションにより 100,000 クローンをスクリーニングした。 S_9 柱頭 cDNA ライブラリーは S_9S_9 の柱頭から ISOGEN と *OligotexTM-dT30 <Super>* mRNA Purification Kit (Takara) を用いて mRNA を精製し、Super Script II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase および cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて 2 本鎖 cDNA を作製した。これを pBluescript II SK (+) の *EcoRI/XhoI* 部位にライゲーションし、 S_9 柱頭 cDNA ライブラリーとした。 S_9 柱頭完全長 cDNA ライブラリー (pGCAP ベクター) は日立計測サービスに外注した。 S_9 柱頭 cDNA ライブラリーは 40,000 クローン、 S_9 柱頭完全長 cDNA ライブラリーは 200,000 クローンをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。ブランクおよびコロニーはニトロセルロース膜 (Hybond-N+) にプロットし、プローブは *MLPK* cDNA を PCR 増幅したものをを用いた。プローブのアルカリフォスファターゼラベルとハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct のプロトコルに従って行った。

結果

MLPK の構造的特徴

MLPK の構造上の特徴をより明確にするために 2 章の RT-PCR 解析により予想された全長のアミノ酸配列 (404 アミノ酸残基) について PROSITE プログラム (<http://kr.expasy.org/prosite/>) を用いてドメインおよびモチーフ検索を行った結果、N 末端部位 (2-7 アミノ酸残基) にミリストイル化モチーフ (MGXXXS/T(R)) の存在が示された (Thompson and Okuyama, 2000、図 22)。また、74-358 アミノ酸残基の領域がプロテインキナーゼドメインとして認識された (図 22)。PROSITE では予測されなかったが、ミリストイル化モチーフとキナーゼドメインの間にはセリン残基を多く含む (33%) 約 30 アミノ酸残基からなる領域 (セリンリッチドメインと命名) が存在した (図 22)。C 末端の 40 アミノ酸はドメインとしては認識されず、また BLAST 検索でも相同配列は見出されなかったため、固有の配列と思われる。

MLPK のアミノ酸配列について BLAST 検索を行った結果、多くのプロテインキナーゼとの相同性が示された。アミノ酸レベルで最も相同性の高かったプロテインキナーゼは *Arabidopsis* の APK1b で 76% のアミノ酸残基の一致が示され、次いで APK1a が 73%、NAK が 61% であった。これらのプロテインキナーゼはレセプターキナーゼのファミリーに属している。*Arabidopsis* のゲノム中には多数のプロテインキナーゼがコードされているが、そのキナーゼドメインの相同性を基に分類した場合、いわゆるレセプター（受容体型）キナーゼ（RLK: receptor like kinase）と同一のグループに分類されるキナーゼが 610 見出されている。その中の一部は細胞外ドメインや膜貫通領域を持たないため、receptor like cytoplasmic kinase（RLCK）と呼ばれ、11 のサブファミリーに分類されている（Shiu and Bleecker, 2001）。MLPK と高い相同性を示した APK1b、APK1a、NAK はいずれも RLCK VII サブファミリーに属するプロテインキナーゼ類であった。*Arabidopsis* の RLCK VII サブファミリーは 46 のメンバーから構成される大きなサブファミリーであるが、ドメイン検索の結果、構成員の約 3 分の 1 がミリストイル化モチーフを持っていることが判明した。またセリンリッチドメインはこのサブファミリーに共通して存在していた（図 22）。

MLPK と最も相同性の高かった APK1b は相同性と MLPK 周辺遺伝子の *Arabidopsis* ゲノムとのシンテニーから *Arabidopsis* の MLPK オースログと予想された。APK1b は APK1a とアミノ酸レベルで 83% の一致があり、*Brassica* にも相同な遺伝子があるかを確かめるためにサザンハイブリダイゼーションを行った。バンドのパターンは MLPK が 1 コピーの遺伝子であることを示しているが、薄くクロスするバンドも見られるため、似通った遺伝子は存在することが示唆された（図 23）。

リン酸化アミノ酸分析

MLPK はアミノ酸配列からセリン/スレオニン型プロテインキナーゼであることが推察され、また第 2 章における発現タンパク質を用いた *in vitro* リン酸化実験により実際に自己リン酸化活性を持つことが示された。しかし、アミノ酸配列からの推察ではリン酸化の対象となるアミノ酸残基を厳密に特定することは出来ないため、発現タンパク質の自己リン酸化時におけるリン酸化アミノ酸の分析を行った。[γ -³²P]ATP 存在下で GST 融合 MLPK タンパク質を自己リン酸化させた結果、セリン残基が最も強く標識されており、スレオニン残基も標識されていたが、チロシンへの ³²P の取り込みは全く検出されなかった。以上の結果は、MLPK がセリン/スレオニン型のプロテインキナーゼであることを強く示唆している（図 24）。

MLPK の脂質修飾

MLPK は N 末端にミリストイル化モチーフを持つことが示唆されたため、*in vitro*

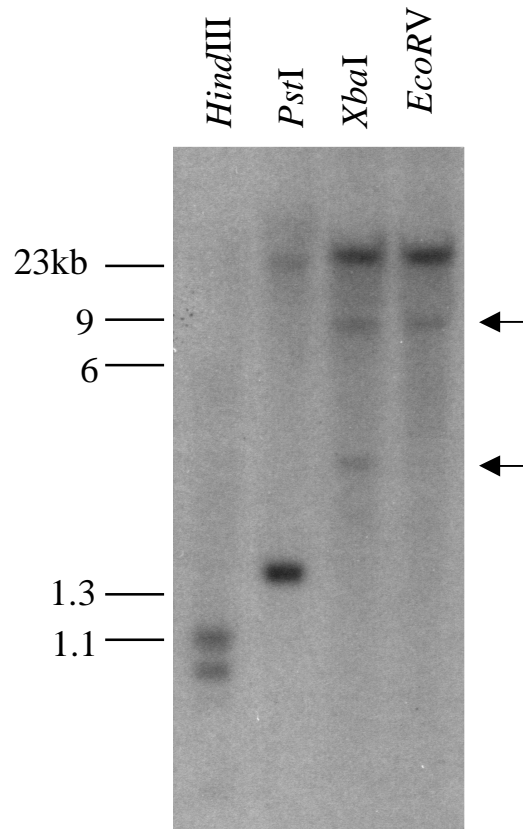


図23 MLPKのサザンブロット解析。MLPKのゲノム領域内には、制限酵素*XbaI*と*EcoRV*で切断される部位はない。矢印は相同遺伝子に由来すると推定されるバンド。HindIIIでは3カ所で切断されるが、2つの断片のハイブリする領域は100 bp<のため検出されない。PstIは1カ所で切断され、1つのメインバンド（1.5 kbp）と1つのマイナーバンド（23 kbp）が観察される。

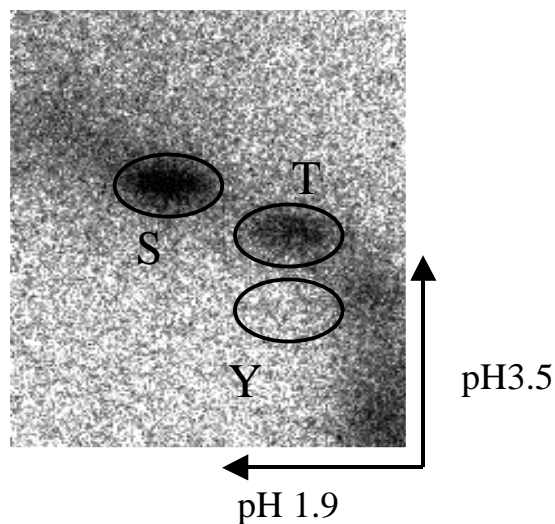


図24 GST融合MLPK発現タンパク質の*in vitro*自己リン酸化におけるリン酸化アミノ酸残基の分析。Sはリン酸化セリン、Tはリン酸化スレオニン、Yはリン酸化チロシン標品の移動位置を示す。

転写翻訳系を用いて、実際にミリスチル化の修飾を受けるかどうかを確認した。タンパク質のミリスチル化は翻訳と同時に進行し、翻訳開始点のメチオニン残基が除去された後に生じた2残基目のグリシンのアミノ基に、*N*-ミリスチルトランスフェラーゼによりミリスチン酸がアミド結合の形で付与されることが知られている(Thompson and Okuyama, 2000)。この反応には2番目のグリシン残基は必須であるため、これをアラニン残基に置換した変異体(MLPK^{G2A})も作製し、コントロールとして用いた。*In vitro* 転写系を用いて MLPK と MLPK^{G2A} の mRNA を作製し、次いで小麦胚芽抽出物中で *in vitro* 翻訳(タンパク質合成)させた。この *in vitro* 転写翻訳系におけるタンパク質合成を確認するために、本系に ³⁵S でラベルされたメチオニンを加えて行った実験では、予想される分子量の位置に MLPK と MLPK^{G2A} と推定される強いバンドが確認された。コントロールとして *in vitro* 翻訳時に mRNA を添加しなかった場合にはこのバンドは検出されなかったことと合わせ、MLPK の翻訳産物が MLPK と MLPK^{G2A} とで同程度合成されているものと判断した(図 25)。次に本系に ³H でラベルされたミリスチン酸を加えて翻訳させたところ、野生型の MLPK では当該タンパク質と推定されるバンドへの放射活性の取り込みが確認され、MLPK がミリスチル化を受けていることが強く示唆された(図 25)。一方、ネガティブコントロールとして用いた MLPK^{G2A} では放射活性の取り込みが認められず、2番目のグリシン残基がミリスチル化されるという予想を強く支持する結果となった(図 25)。

MLPK の局在

N-ミリスチル化を受けたタンパク質はしばしば細胞膜局在性を示すことが知られているため、MLPK の植物細胞内における局在性を解析した。MLPK と GFP の融合タンパク質をタバコ培養細胞のプロトプラスト中に一過的に発現させ、GFP 由来の蛍光の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した(図 26)。コントロールとして GFP のみを発現させた細胞では、GFP の蛍光は主に核と細胞質で検出されたのに対して、MLPK-GFP 融合タンパク質を発現させた細胞では、主に細胞膜上に局在することが示された。また、*in vitro* 翻訳系においてミリスチル化を受けないことが示された変異型 MLPK^{G2A} を GFP 融合タンパク質として発現させた場合には、GFP の蛍光はコントロールと同様に核と細胞質で検出された。以上の結果は、MLPK が植物細胞内においても *N*-ミリスチル化の翻訳後修飾を受けること、またその結果として細胞膜局在性を示すことが強く示唆された。

実際の *B. rapa* の柱頭中における MLPK の局在を確認するために、柱頭抽出物を分画した後にウエスタンブロッティング法により MLPK を検出した。まず柱頭抽出物を超遠心分離によりミクロソーム画分と細胞質画分に分画したところ、MLPK はミクロソーム画分にのみに検出された(図 27)。さらに、ミクロソーム画分から aqueous

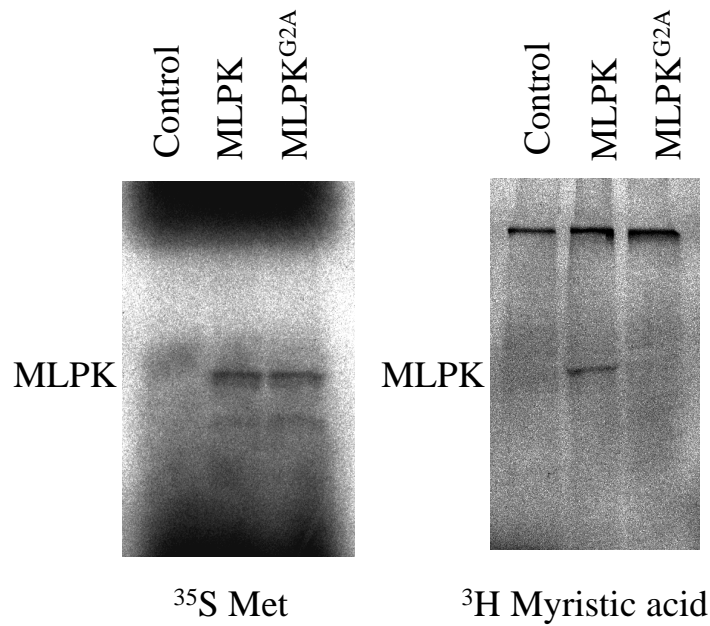


図25 MLPKの*in vitro*翻訳系におけるミリスチル化試験。
³⁵S標識メチオニン存在下(左図)あるいは³H標識ミリスチン酸存在下(右図)において、MLPKあるいは変異型MLPK^{G2A}のmRNAを小麦胚芽抽出物中で翻訳させた後、SDS-PAGEに供し、MLPKタンパク質の翻訳・修飾をオートラジオグラフィにより検出した。mRNAを添加せずに同反応を行ったものをControlとした。

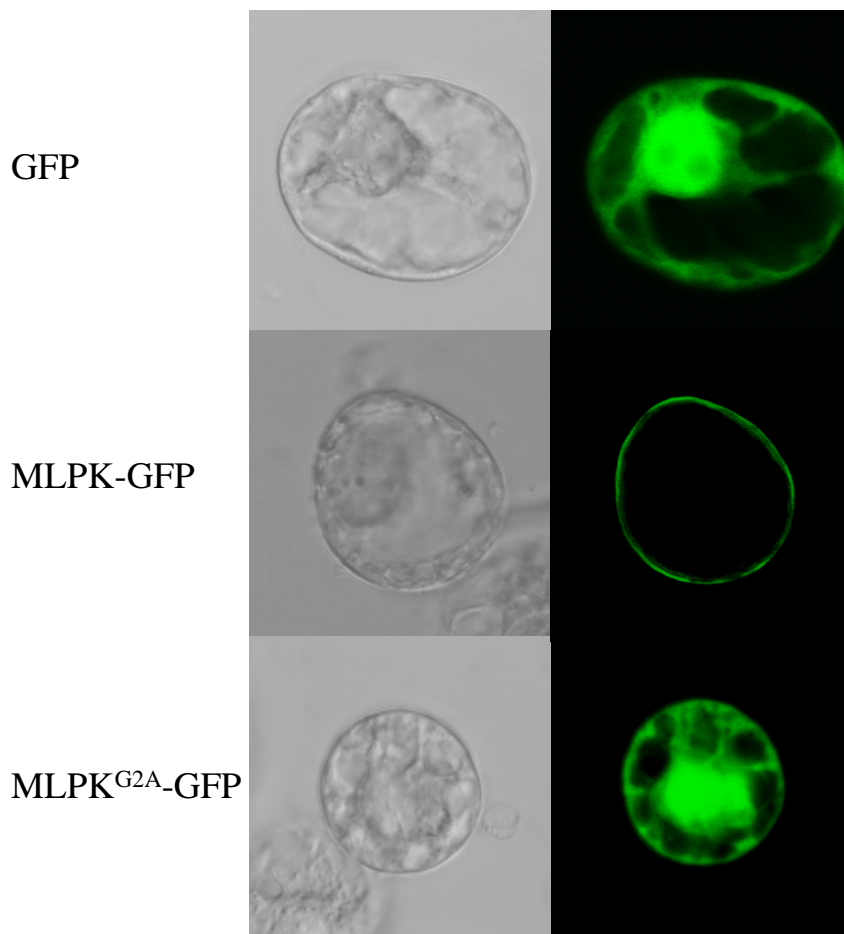


図26 タバコBY-2細胞プロトプラストにおけるGFP融合MLPKの細胞内局在。共焦点顕微鏡による明視野（左）、GFPの蛍光（右）の画像。

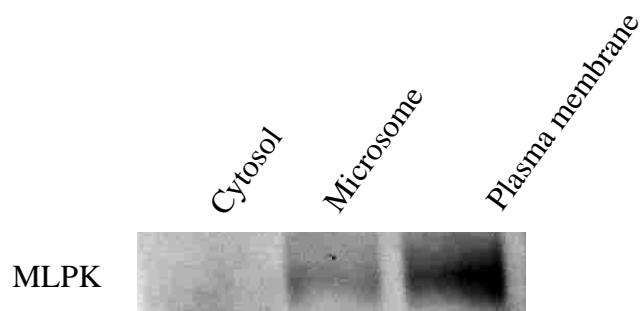


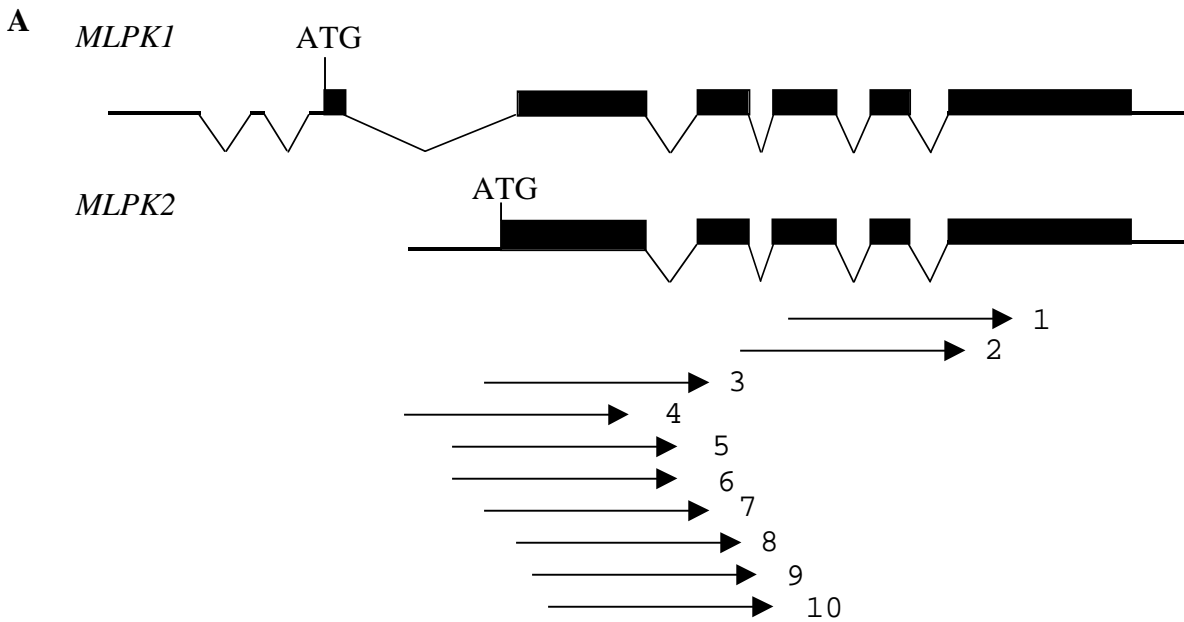
図27 *B. rapa*柱頭におけるMLPKの細胞膜局在性。柱頭抽出物を細胞質画分、ミクロソーム画分、細胞膜濃縮画分に分画し、MLPK抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した（6 μ gタンパク質/レーン）。

two-phase partitioning 法により細胞膜画分を濃縮すると、MLPK も同画分に濃縮されることが示された。以上の結果は、*B. rapa* の柱頭内においても、MLPK が細胞膜上に局在していることを強く示唆している (図 27)。

MLPK の転写調節

MLPK の完全長 cDNA を得るために Race PCR を行い、増幅したバンドを TA クローニングして塩基配列を決定した。5' Race PCR は mRNA の 5' 末端のキャップ構造を特異的に選抜して増幅できる Gene Racer Kit を使用したが、シーケンスの結果、さまざまな長さの PCR 産物が得られ、その配列からコードするアミノ酸配列の N 末端構造が異なる 2 種類のクローンに分けられた。2 種類の転写産物の最も長いクローンの構造を示す(図 28A)。その 1 つは ORF 予測ソフトで予想された配列や *Arabidopsis* で報告されている *MLPK* オーソログ *APK1b* と同じ翻訳開始点を持つもので、8 つのエキソンと 7 つのイントロンを持っていた。もう 1 つはその第 3 イントロンから転写が始まっており、第 3 イントロン内にもう 1 つの予想翻訳開始コドンを持っていた。ここでは前者を *MLPK1*、後者を *MLPK2* と呼ぶ。*MLPK1* と 2 の配列の違いは *MLPK1* の N 末端の 17 アミノ酸が第 3 イントロンのコードする 23 アミノ酸に置換されているだけである (図 28B)。Race PCR でのクローンは *MLPK2* のほうが圧倒的に多かったが、*MLPK1* が ORF 予測ソフトで予想されたことや *Arabidopsis* の *MLPK* オーソログ *APK1b* が *MLPK1* と同じエキソン、イントロン構造を持っていることから、*MLPK2* は Race PCR を行った時のアーティファクトではないかと考えられたため、cDNA ライブラリーの中から *MLPK* のクローンをスクリーニングすることを試みた。 S_{36} 柱頭 cDNA ライブラリーを 100,000 クローン、 S_9 柱頭 cDNA ライブラリーを 40,000 クローン、 S_9 柱頭完全長 cDNA ライブラリーを 200,000 クローンスクリーニングし、それぞれ 2、1、7 つのクローンを得た (図 28A)。この内の 4 クローンは 5' 側がエキソン内で終わっており、逆転写が最後まで進んでいないか、mRNA が分解しているものと予想され、*MLPK1* か 2 の区別は付かなかった。残りの 5 クローンについてはすべて *MLPK2* をコードしており、*MLPK2* が柱頭で mRNA として存在することが確認され、また柱頭においては *MLPK2* が *MLPK1* よりも転写量が多いことが予想された。*MLPK2* のアミノ酸配列は *Arabidopsis* のオーソログ *APK1b* でもよく保存されていた (図 28B)。

MLPK が 2 種類の転写産物をもつことはそれらが異なる転写調節を受けている可能性が考えられる。その可能性を確かめるために 2 種類の転写産物を特異的に増幅できるプライマーを作製し、半定量 RT-PCR を行った。*MLPK1* は薬を除いた柱頭、葉、茎で同程度発現している一方で、*MLPK2* は柱頭で特異的に発現しており、他の組織ではほとんど検出されなかった(図 29)。ノーザンプロット解析の結果では *MLPK*



B

MLPK1

MLPK 1ATGGGGATTTGCATGAGTGTTTCAGGTTAAAGCTGAGAGTCCAAGTAACACAGGTGCGAGT
 M G I C M S V Q V K A E S P S N T **G A S**

APK1b 1atggggatttgcttaagtgctcagattaaagctgtgagtcca-----ggtgcaagt
 M G I C L S A Q I K A V S P G A S

MLPK2

MLPK 1ATGGGTTTTGTGAAAAAAGTGCAATCAAAAAGTTTTTTTATATGTAAACTATTTGTTTGGTGTTCATAGGTGCGAGT
 M G F V K K V Q S K V F L Y V N Y L F G V C I **G A S**

APK1b 1atgggatttgctgaaaaaagtgaagtctaacgtttttttgtatgcaaaactatgtgtttggttgttgtataggtgcaagt
 M G F V E K V K S N V F L Y A N Y V F G C C I **G A S**

図28 *MLPK*の2つの異なる転写産物 (*MLPK1*および*MLPK2*)。A、*MLPK1*と2のcDNA構造。矢印は*B. rapa*柱頭のcDNAライブラリー中に見出された*MLPK* cDNAクローン (No. 1-10)の5'開始位置を示している。No. 1, 2は*S*₃₆ホモ系統柱頭cDNAファージライブラリー由来、No. 3は*S*₉ホモ系統柱頭cDNAライブラリー由来、No. 4-10は*S*₉ホモ系統柱頭完全長cDNAライブラリー由来のクローンである。B、*MLPK1*および*MLPK2*と*Arabidopsis*におけるオーソログ遺伝子と推定される*APK1b*との塩基、アミノ酸配列比較。太字で示したGAS以降のアミノ酸配列は、*MLPK1*および*MLPK2*で同一である。

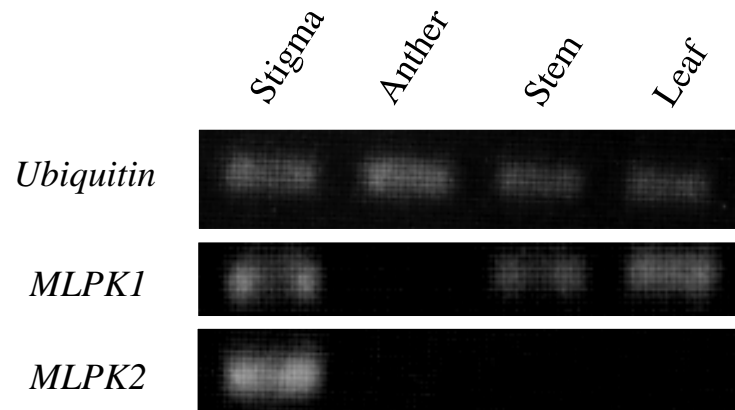


図29 *MLPK*遺伝子発現の組織特異性。*MLPK1*および*MLPK2*の柱頭、葯、茎、葉における発現を特異的プライマーを用いたRT-PCR法により解析した。ユビキチンはコントロール。

の発現は葉や茎では非常に弱く、*MLPK1* が他の組織と同程度の発現量であったことは *MLPK2* が柱頭において主な転写産物であることを示唆している。

MLPK2 の性質

MLPK2 は N 末端の 23 アミノ酸が *MLPK1* とは異なっており、PROSITE プログラムではミリスチル化モチーフは見出されなかった。一方、柱頭抽出物の生化学的解析では MLPK は細胞膜に検出されたため、MLPK2 が細胞膜に局在するのかを調べるために、MLPK1 の局在を調べたときと同様に GFP 融合タンパク質としてタバコのプロトプラストで発現させたところ、細胞膜に主に GFP の蛍光が観察され、MLPK2 も細胞膜に局在していることが示唆された (図 30)。MLPK2 はコンピュータプログラムではミリスチル化モチーフを持つとは予想されないが、ミリスチル化モチーフは 2 番目のグリシンが必須である他は比較的曖昧なモチーフであり、MLPK2 も 2 番目のアミノ酸はグリシンであるため、ミリスチル化されている可能性がある。これを確かめるために、MLPK2 の G2A 変異型の GFP 融合タンパク質のコンストラクトを作製し、タバコのプロトプラストで発現させた。MLPK2^{G2A} は野生型と同様に主に細胞膜に見いだされ、MLPK1 とは異なる分子機構で細胞膜に局在していることが予想された (図 30)。ハイドロパシープロットによる MLPK2 の解析では N 末端が非常に疎水性となっており、N 末端が細胞膜に突き刺さっている可能性も考えられる (図 31)。

MLPK1 については相補試験により *m1* 変異を相補することが示されたが、*MLPK2* について不明である。そこで、*MLPK2* についても *m1* 変異を相補できるかをパーティクルガンを用いた一過的相補試験によって確認した。*MLPK2* を発現させた *S₈S₈m1m1* 株の乳頭細胞は和合花粉を受け入れたが (花粉管の乳頭細胞への進入率、61%)、不和合花粉は拒絶した (20%)。この結果は *MLPK2* も *m1* 変異を相補するのに十分であることを示している。

考察

ここでは *MI* 遺伝子がコードする MLPK がレセプターキナーゼファミリーの膜アンカー型セリン/スレオニンキナーゼであり、細胞膜に局在することを明らかにした。さらに、*MLPK* は少なくとも 2 種類の転写産物を持ち、それぞれ開始コドンの異なる翻訳産物をコードする RNA を生成することを明らかにした。

MLPK1 の最も長い mRNA は 5' UTR が 307 bp あり、2 つのイントロンが含まれている。脊椎動物の mRNA の 90% は 10 から 200 bp の長さであり、このような長い 5' UTR は少ない (Kozak, 1987)。このような長い 5' UTR を持つ mRNA はしばしばタンパク質の合成に影響することが明らかになっており、5' UTR によるタンパク質発現の

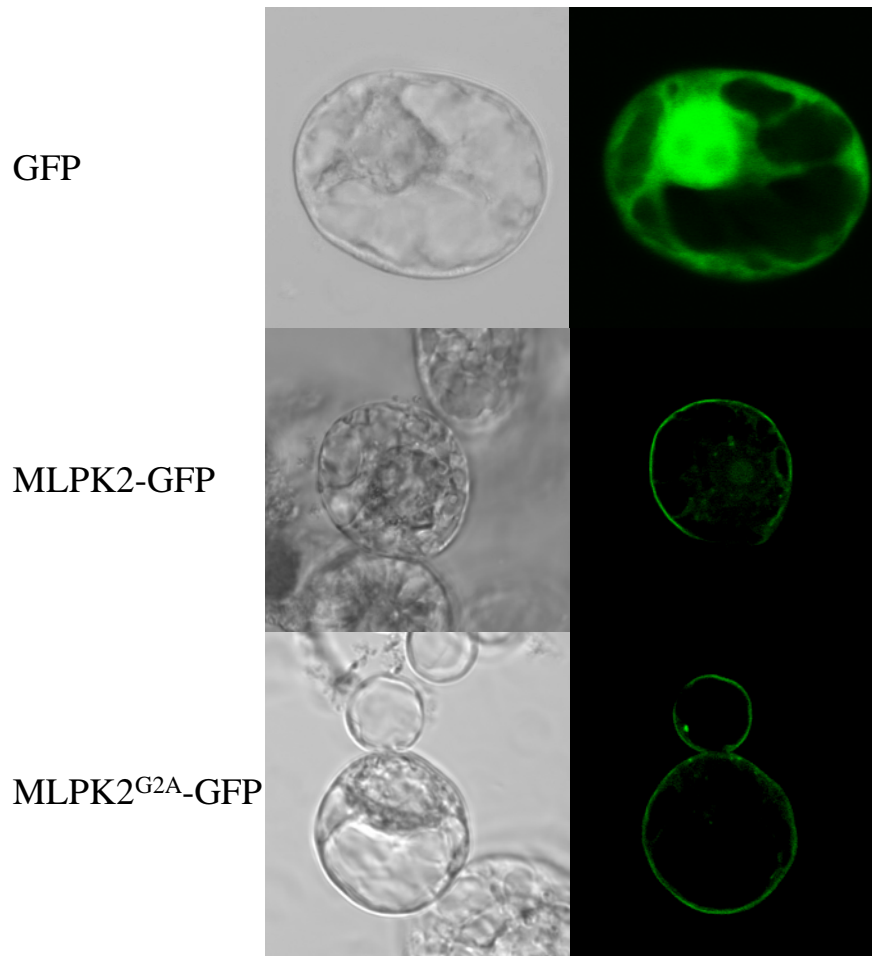


図30 タバコBY-2細胞プロトプラストにおけるGFP融合MLPK2の細胞内局在。共焦点顕微鏡による明視野（左）、GFPの蛍光（右）の画像。

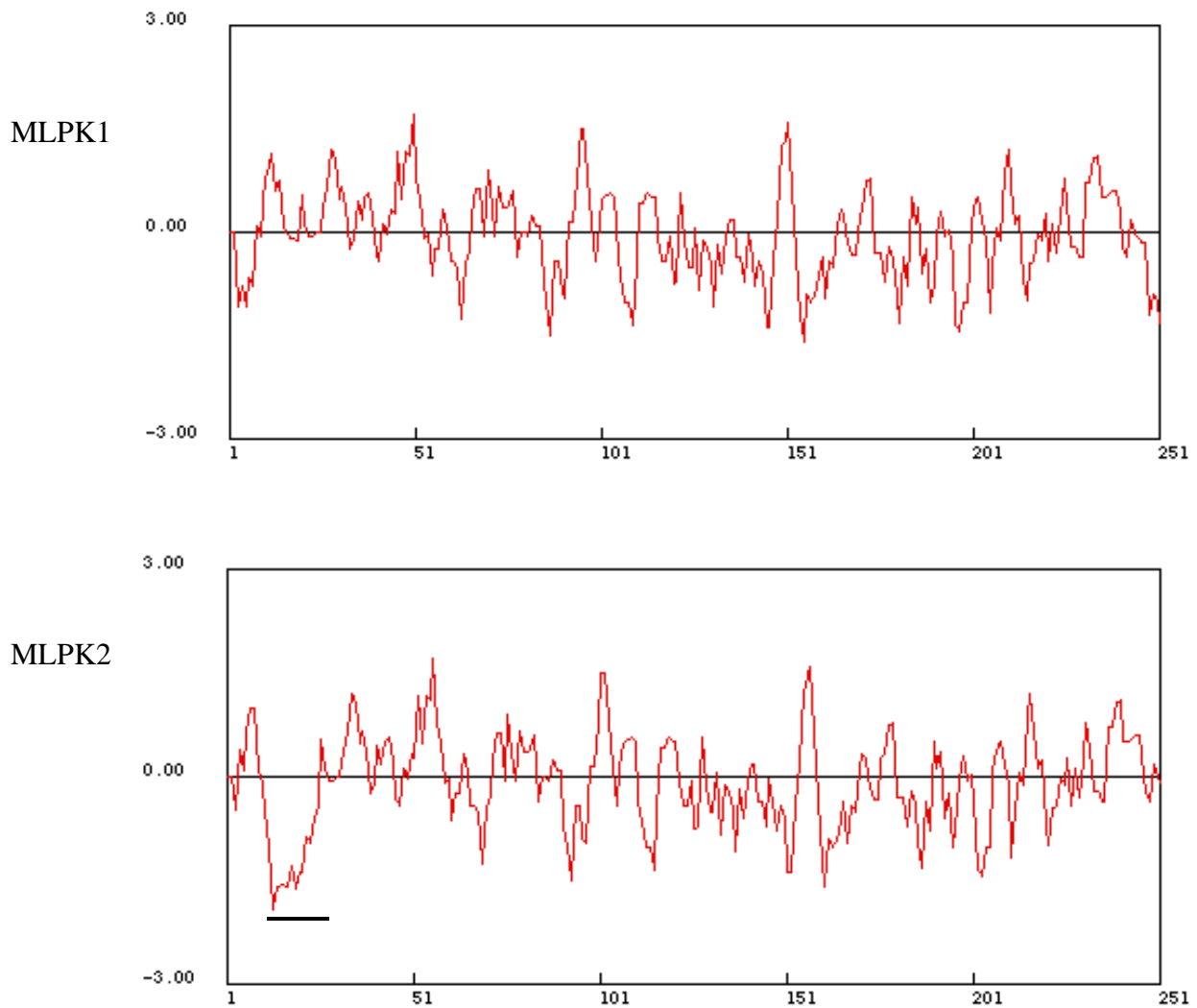


図31 MLPK1および2のヒドロパシープロット。HoppとWoodsのパラメーターを使用した。縦軸は親水性度を、横軸はアミノ酸配列の順序を示す。太実線で示す領域が、MLPK2に特異的に存在する疎水性領域。

転写後調節はこれまでに翻訳開始時の mRNA スキャンにおける構造的阻害、uORF (upstream open reading frames) による調節、IRES (internal ribosome entry segments) によるキャップ非依存的翻訳の 3 つのメカニズムが知られている(Willis, 1999)。uORF は mRNA の開始コドンの上流に ORF を持つもので、植物では約 20% の mRNA が uORF を持っており (Kochetov *et al.*, 2002)。MLPK1 は 307 bp の 5' UTR に 6 つの uORF を持っている。uORF はどのクラスの遺伝子に含まれるかというコンセンサスはないが、脊椎動物においてはガン遺伝子や細胞の成長、分化に関わる遺伝子の多くにみられることが知られている (Willis, 1999)。uORF のタンパク質合成調節のメカニズムはまだほとんど未解明であるが、翻訳量の減少、mRNA の安定性、下流のシストロンの組織特異的な発現の調節などの機能を持っているため (Morris and Geballe, 2000)、*MLPK1* の転写後調節に関わっているのかもしれない。

MLPK には開始コドン位置の異なる 2 種類のを持つ転写産物が存在した。*MLPK1* はミリストイル化モチーフを持ち、*Arabidopsis* の多くのホモログの N 末端と相同性が見られること、*MLPK1* の転写開始点には TATA ボックスが存在し、ORF 予測ソフトで予想されるアミノ酸配列であること、RT-PCR で全長 cDNA が増幅したことから、*MLPK1* が *M1* 遺伝子のコードするタンパク質として解析を進めてきた。しかしながら、柱頭 cDNA ライブラリーのスクリーニングの結果や RT-PCR による発現解析の結果は *MLPK2* がメインの転写産物であることを示唆している。一過的発現による相補試験の結果は *MLPK1*、2 とともに *m1* 変異を相補できることを示しているが、RT-PCR の発現解析の結果は *MLPK1* が葯を除く全身で発現しており、*MLPK2* が柱頭特異的に発現していることから、柱頭における自家不和合反応に主に関わっているのは *MLPK2* であると予想される。*MLPK1* と 2 は N 末端にそれぞれ 17、23 アミノ酸が特異的な配列を持っているだけで、後は全く同じアミノ酸をコードしているためお互いは冗長性を持っていると容易に想像される。それゆえ *MLPK1* は一過的に大量に発現させれば *m1* 変異を相補できるのであろうが、その発現パターンを考慮に入れると他のシグナル伝達にも関わっているのかもしれない。*Arabidopsis* の *MLPK* オーソログである *APK1b* は *MLPK1* タイプの転写産物しかデータベース上には存在しないが、ゲノム配列には *MLPK2* に相当する配列が高く保存されており、自家和合性である *Arabidopsis* がかつて自家不和合性であった頃は柱頭で自家不和合性反応に関わっていたと思われる。*Arabidopsis* において *SLG*、*SRK*、*SP11*、*ARCI* は痕跡が認められるものはあるが (Kusaba *et al.*, 2001)、機能する遺伝子としては残っていない。このように自家不和合性反応に必要な遺伝子は自家和合種への進化の過程で失われてしまったと予想されるが、*MLPK* のオーソログである *APK1b* が *Arabidopsis* で残っていたのは *MLPK1* が自家不和合性とは異なる機能を果たしており、*APK1b* が失われると淘汰圧がかかるからなのかもしれない。

MLPK1 と 2 は異なる発現パターンを示すこと、*MLPK2* は *MLPK1* の第 3 イントロンから始まっており、また第 3 イントロンは 570 bp と比較的長い構造を持っていること、転写開始点が大きく離れていることから *MLPK1* と 2 は異なるプロモーターによって制御されていると予想される。このように 1 つの遺伝子が転写開始点および開始コドンを持つ 2 つの遺伝子産物をコードしているケースは珍しいが、いくつかの例は報告されている。例えば、TNF (tumor necrosis factor) のレセプターをコードしている *p75TNFR* は第 1 エキソンの上流にもう 1 つの転写開始地点エキソン 1a があり、ここからも転写が開始される (Seitz *et al.*, 2001)。この *icp75TNFR* と呼ばれる mRNA は第 1 エキソンをとばして第 2 エキソンへとつながり、エキソン 1a にある開始コドンから翻訳されるため、MLPK のように *p75TNFR* とは異なる N 末端を持つ (Seitz *et al.*, 2001)。 *p75TNFR* が細胞膜でレセプターとして機能しているのに対して、*icp75TNFR* はシグナルペプチドがなく細胞内で機能しているようである (Seitz *et al.*, 2001)。また、植物においてもイネの KNOX ファミリーのホメオボックス遺伝子、*HOS58*、*HOS59*、*HOS66* の 3 つの遺伝子がイントロンの中にもう一つの転写開始点を持ち、異なる遺伝子産物を作り出している (Ito *et al.*, 2002)。 *HOS58*、*HOS59* は第 2 エキソン内のメチオニンを開始コドンにしているが、*HOS66* は *MLPK* と同様にイントロン内にもう一つの開始コドンを持っている (Ito *et al.*, 2002)。また、これらの遺伝子は異なる遺伝子産物が組織特異的な発現パターンを示し、それぞれの組織で特異的な転写活性を持っていると考えられている (Ito *et al.*, 2002)。 *MLPK2* の上流について TFSEARCH プログラム (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) を用いて転写因子の予想結合部位を検索したところ、*MLPK1* の第 1 エキソンの中に SBF-1 結合部位 (Lawton *et al.*, 1991) が検出されたが、これが柱頭特異的な *MLPK2* の発現に関わっているか、もしくは他にプロモーター領域があるのかは更に調べる必要があるだろう。

MLPK はレセプターキナーゼファミリーに属するキナーゼであった。ゲノムの解読の終了している *Arabidopsis* においてレセプターキナーゼのファミリーに属する遺伝子は 610 と報告されており、それらのうち 24% は細胞外ドメインを持たない RLCK である (Shiu and Bleecker, 2001)。RLCK の多くはサブファミリーを形成しており、*MLPK* は *Arabidopsis* での分類における RLCK VII サブファミリーに属する。このサブファミリーは 46 のメンバーからなっているがこれらのプロテインキナーゼの機能はほとんどわかっていない。唯一機能が示されているものは *PBS1* で、*Arabidopsis* の病原菌 *Pseudomonas syringae* の *avrPphB* に対応する *R* 遺伝子としてクローニングされた (Swiderski and Innes, 2001)。 *PBS1* はプロテアーゼである *avrPphB* によって特異的に切断され、このプロセスが同じ *avrPphB* の *R* 遺伝子産物である *RPS5* を介した抵抗性反応に重要なことが明らかになっている (Shao *et al.*, 2003)。他にも部分的

に解析されたものとして APK1a, b (Hirayama and Oka, 1992), NAK (Moran and Walker, 1993), APK2a (Ito *et al.*, 1997), ARSK1 (Hwang and Goodman, 1995) がある。APK2a は花芽形成に関わるホメオ遺伝子 AGAMOUS がプロモーター領域に結合する遺伝子としてクローニングされ、この過程に関わっていると予想されている (Ito *et al.*, 1997)。また ARSK1 は根で特異的に発現し、乾燥、ABA、NaCl によって誘導されるため、浸透圧ストレス時に働いていることが推定されている (Hwang and Goodman, 1995)。Arabidopsis における MLPK のオーソログは相同性が最も高く、周辺のゲノム配列が BAC251-22 のシーケンスとのシンテニーがある APK1b と予想される。MLPK はアミノ酸レベルで APK1b と 76%、APK1a とは 73% の相同性があり、また APK1b は APK1a と 82% の相同性がある。APK1a と b は縮重プライマーを用いた PCR によってクローニングされてきたプロテインキナーゼで、APK1a は *in vitro* においてキナーゼ活性があることが確認されているが、植物体での役割についてはわかっていない (Hirayama and Oka, 1992)。MLPK はレセプターキナーゼシグナル伝達に関わることが示された初めての RLCK であり、他の RLCK もレセプターキナーゼの介するシグナル伝達に関わっていることが示唆される。

In vitro におけるリン酸化アミノ酸分析の結果、MLPK はセリンとスレオニンの特異的にリン酸化していた。Arabidopsis の MLPK ホモログである APK1a およびこのサブファミリーのキナーゼは部分的にチロシンキナーゼに似ているところがあり (Hardie, 1999)、また APK1a を大腸菌で発現させ、菌体の抽出物をリン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットングすると、リン酸化チロシン抗体に反応するバンドが複数検出されるため、APK1a はチロシンキナーゼ活性もあると報告されている (Hirayama and Oka, 1992)。一方で、APK1a の *in vitro* のリン酸化実験ではセリンとスレオニンが特異的にリン酸化されているため、APK1a は本当のチロシンキナーゼではないと指摘されている (Hardie, 1999)。MLPK の *in vitro* 自己リン酸化実験の結果も MLPK はセリン/スレオニンキナーゼであることを示唆している。

プロテインキナーゼの多くは通常の状態では不活性な状態にあり、シグナルが伝わると活性な状態となる。単分子で不活性化しているプロテインキナーゼはしばしばキナーゼドメインの N 末端もしくは C 末端側のドメインが偽基質として、もしくはアロステリックにキナーゼを不活性化していることが知られている (Huse and Kuriyan, 2002)。セリンリッチドメインはモチーフ検索プログラムでは機能するドメインとして検出されるものはなかったが、動物においてはタンパク質の活性をリン酸化依存的に制御するドメインとして機能することが報告されている (Inglés-Esteve *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2003)。MLPK の N 末端にあるセリンリッチドメインの役割ははっきりしていないが、MLPK2 の N 末端 40 アミノ酸を欠いた GST 融合タンパク質の *in vitro* 自己リン酸化活性が全長のそれよりも高くなって

いたため（データは示さず）セリンリッチドメインが何らかの形で MLPK のリン酸化活性を負に制御していることを示唆している。

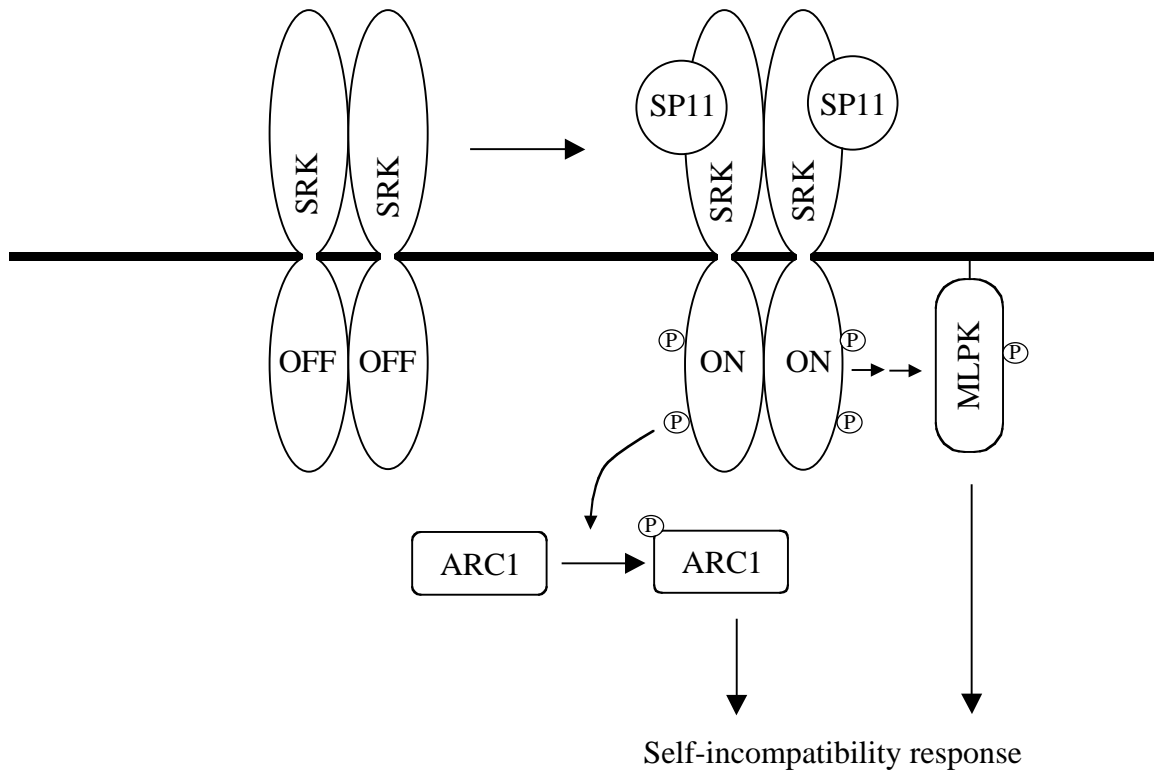
MLPK は GFP 融合タンパク質の一過的発現による細胞内局在の観察と柱頭抽出物の分画によるウエスタンブロット実験より、膜アンカー型のプロテインキナーゼであることが明らかになった。MLPK1 の N 末端にはミリスチン酸が修飾され、この脂質鎖が細胞膜に突き刺さって、膜に局在していると思われる。これは G2A 変異型の MLPK1 が膜局在しないという結果からも支持される。タンパク質のミリスチル化は膜への局在に重要な役割を果たすが、長期間の膜での滞在に十分な疎水性はもっておらず、安定な膜への局在にはさらに脂質が付加されるか、タンパク質の中に塩基性のドメインを持つことが必要である（Cadwallader *et al.*, 1994）。ミリスチル化されるタンパク質のミリスチル化モチーフの中にあるシステインはしばしばパルミトイル化され、膜に安定に局在できるようになることが知られているが（Thompson and Okuyama, 2000）MLPK1 の 4 つめのアミノ酸のシステインは RLCK VII サブファミリーの中でもよく保存されており、パルミトイル化されることにより細胞膜に安定に局在していることが予想される。また、MLPK1 の予想等電点は 9.0 であり、塩基性のタンパク質である。塩基性のドメインは膜の負電荷を持つリン脂質と静電的相互作用し、タンパク質の膜への局在を安定化するため、MLPK1 が塩基性タンパク質であることも細胞膜への局在を安定化させているのかもしれない。脊椎動物における protein kinase C の基質である MARCKS（myristoylated alanine-rich C kinase substrate）はミリスチル基と塩基性ドメインで細胞膜に局在しており、塩基性ドメイン内にあるセリン残基がリン酸化されると静電的相互作用が失われ、細胞質に移行することが知られている（McLaughlin and Aderem, 1995）。MLPK も C 末端のホモロジーを持たない領域にアルギニンとリジンのクラスターがあり、SRK シグナルでリン酸化されることによって細胞質に移行することが期待されたので、不和合受粉および和合受粉後の柱頭での MLPK の局在を調べたが、MLPK の細胞質への移行は認められなかった（データは示さず）。それゆえ MLPK はおそらく細胞膜上で機能していると思われる。

ml 変異は柱頭でのみ自家和合性になること、SRK に対して上位にあることから、自家不和合性シグナル伝達において重要な働きをしていると考えられてきた（Hinata *et al.*, 1983）。MLPK の生化学的な役割を明らかにすることはできなかったが、MLPK がプロテインキナーゼであることから SRK の下流でターゲットタンパク質をリン酸化することによるシグナル伝達の一員として重要な働きをしていると予想される。MLPK が膜タンパク質であることは膜貫通型レセプターキナーゼである SRK に近いところで働いていることが予想され、SRK の直接のターゲットであることが期待される。しかしながら、酵母の two-hybrid システムを用いた試験では SRK のキナーゼ

ドメインと MLPK の結合は検出されなかった。また、SRK と相互作用し、自家不和合性シグナル伝達のポジティブエフェクターとして働いている ARC1 と MLPK との結合も検出できなかった。これは SRK と MLPK の間にまだ他のシグナル伝達に関わる因子が必要であるか、SRK の全長を含み、SP11 によって活性化された状態でないと結合しないか、もしくは結合が弱く相互作用が検出されないなどの原因が考えられる。

MLPK の自家不和合性反応におけるシグナル伝達のモデルとして次のようなものを提案する。1 つは MAP キナーゼカスケードのように SRK の下流で SRK に直接または間接的にリン酸化され、活性化された MLPK がさらに下流のターゲットをリン酸化しシグナルを伝えていくモデルである (図 32A)。すでに報告されているように SRK と直接結合する ARC1 は活性化した SRK に結合、リン酸化された後、細胞内の未知のターゲットタンパク質をユビキチン化、分解することによって自家不和合性反応を引き起こしていると考えられている (Stone *et al.*, 2003)。前者のモデルで考えた場合、SP11 によって活性化された SRK は直接 ARC1 をリン酸化するため、MLPK 非依存的に活性化されると予想される。しかしながら、少なくとも *S₈S₈mlm1* 株において完全に自家不和合性になるということは、ARC1 が自家不和合性反応に必要であるという結果に矛盾する。もしくは花粉の拒絶反応における ARC1 経由の自家不和合性反応の役割が非常に小さく、この経路だけでは花粉を拒絶するのに十分な反応は起こすことができないことを意味している。もう 1 つのモデルとして MLPK が SRK とのレセプター複合体を形成し、リン酸化などによって SRK を完全な活性型にするモデルが考えられる (図 32B)。動物の膜アンカー型プロテインキナーゼである Src ファミリーキナーゼはレセプターチロシンキナーゼシグナル伝達においてレセプターと結合し、レセプターキナーゼの活性を相乗的に高めていることが知られている (Thomas, 1997)。このモデルの場合、SP11 と結合した SRK はそうでないものと比べればリン酸化活性は上がっているが、自家不和合性反応を引き起こすのに十分な活性は持たないことを想定する。*ml* 変異体においては MLPK の下流だけではなく SRK 自身も完全には活性化しないことにより、ARC1 のような SRK の直接のターゲットにも十分なシグナルは伝わらず、自家不和合性反応は起こらなくなることが予想される。このモデルならば動物のレセプターキナーゼで見られるような、レセプターから複数のシグナル伝達経路が分岐をするような場合でも MLPK の変異によって自家不和合性が完全に打破されることもうまく説明することができる。SRK のレセプター複合体に MLPK が結合してリン酸化やタンパク質間の相互作用などにより SRK レセプター複合体をより活性化することによって自家不和合性反応が引き起こされるモデルは MLPK の役割を理解する上で魅力的なものだと思われる。MLPK の生化学的な役割について更に解析することにより、レセプターの活性化や SRK を介

A



B

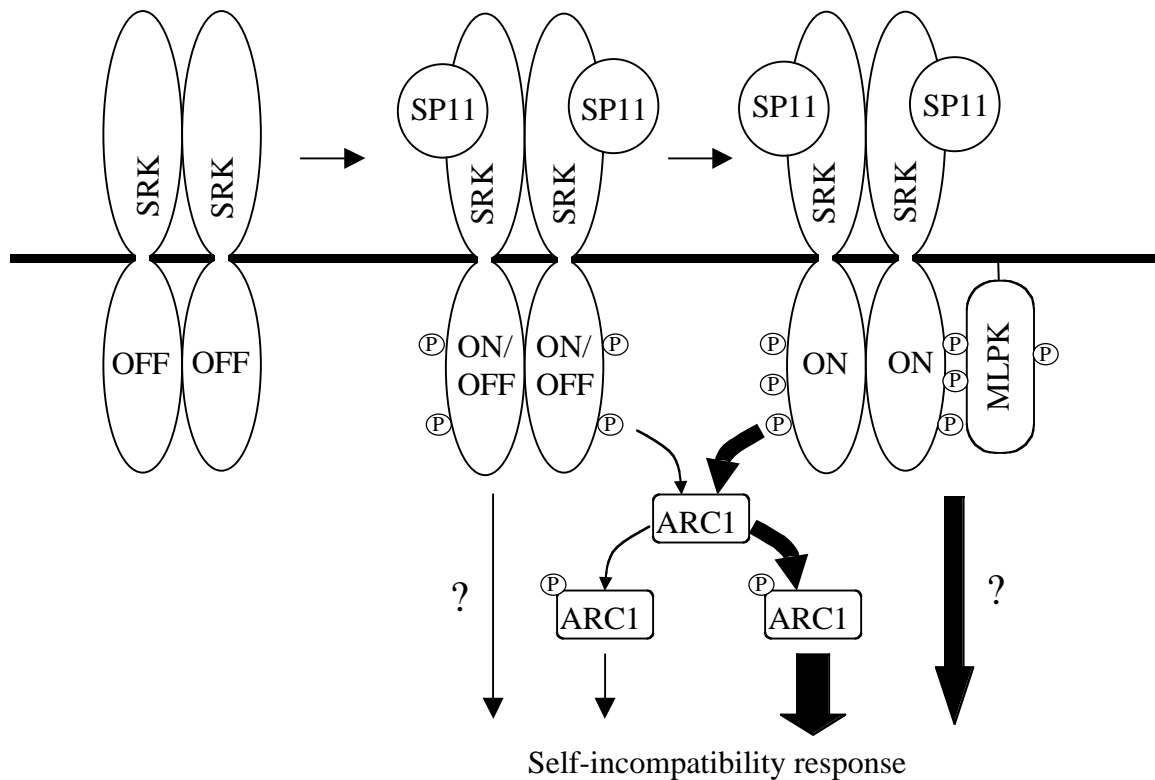


図32 自家不和合性シグナル伝達のモデル。A、MLPKがSRKの下流で働いているモデル。このモデルではMLPKとARC1は異なる経路をたどる。B、MLPKがSRKとレセプター複合体として機能しているモデル。MLPKはSRKの活性化を促進し、SRKのARC1へのリン酸化活性にも影響を与える。SRKからARC1を介さない経路が存在してもMLPKはその活性を制御している。

したシグナル伝達の分子機構がさらに明らかになると期待される。

総括

自家不和合性は自らの花粉が花柱において拒絶される現象で、その自他別認識機構は長い間人々の関心を集めてきた。アブラナ科植物の自家不和合性は *S* 遺伝子座の 2 つの遺伝子産物 SP11 と SRK による *S* 遺伝子特異的な相互作用によって引き起こされ、また自家不和合性反応がレセプターキナーゼによって引き起こされることから、植物におけるレセプターキナーゼシグナル伝達のモデルとしても注目を集めてきた。

本研究ではほとんど明らかになっていないアブラナ科植物の自家不和合性シグナル伝達の分子機構を解明することを目的に SRK の下流で重要な働きをしていると考えられている *M1* 遺伝子のポジショナルクローニングを行った。研究対象とした自家不和合性株 *B. rapa* var. Yellow Sarson は *S* と *m1* の 2 つの遺伝子の変異からなり、*m1* 遺伝子はアクアポリン遺伝子 *MOD* であると報告されていた。しかし、今回行った遺伝学的解析の結果は Yellow Sarson が *S* と *m1* 遺伝子に加え、更に自家不和合性に関わる遺伝子座 *m2* にも劣性の変異を持つこと、*MOD* は *M1* 遺伝子の本体ではないことを明らかにした。*m1* 変異体は完全な自家不和合性を示すのに対し、*m2* 変異体は弱いながらも自家不和合性反応を示すことから、*M2* 遺伝子産物は *M1* 遺伝子産物の下流で機能していることが予想された。

M1 遺伝子座のマッピングと BAC クローンによる物理地図の作製によって *M1* 遺伝子座を 50 kbp の領域まで絞り込み、その中にプロテインキナーゼをコードする *MLPK* を見出した。*MLPK* mRNA は柱頭で強く発現しており、その発現パターンが自家不和合性の獲得時期と一致すること、*m1* 変異体では機能を失っていること、*MLPK* を *m1* 変異体に一過的に発現させると自家不和合性が回復することから *M1* 遺伝子の本体であることが確認された。

MLPK は *Arabidopsis* におけるキナーゼの分類において RLCK VII のサブファミリーに属する。細胞外ドメインを持たない RLCK は *Arabidopsis* の持つ 610 の構成員からなるレセプターキナーゼファミリーの 24% を占めるが、その機能はほとんど明らかにされていない。*MLPK* は RLCK がレセプターキナーゼシグナル伝達に関わっていることを示す初めての例であり、今後他の RLCK についてもレセプターキナーゼを介したシグナル伝達系への関与が明らかになっていく可能性が期待される。

m 遺伝子の初めての報告から 20 年の時を経てようやくその実体が明らかとされた。自家不和合性シグナル伝達において *MLPK* は膜アンカー型プロテインキナーゼであることから SRK の近傍で機能することが予想される。*MLPK* と相互作用するタンパク質を同定することが、*MLPK* の自家不和合性における役割を知る上で、また植物のレセプターキナーゼシグナル伝達の分子機構を理解するための重要な知見を与えてくれるだろう。

謝辞

本研究を進めるにあたり御指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学教授磯貝彰先生、同助教授高山誠司先生、同助手柴博史先生、同助手蔡晃植先生、同教務職員岩野恵先生に厚く御礼申し上げます。東北大学名誉教授日向康吉博士および岩手大学助教授渡辺正夫博士より Yellow Sarson の種子と S_{36} 柱頭 cDNA ライブラリーを、理化学研究所宮脇敦博士より GFP のコンストラクトを、本学助手加藤晃博士よりタバコ BY-2 細胞をいただきましたので深く感謝いたします。京都大学助教授奥本裕博士には 線変異株の作製に協力していただきましたので御礼申し上げます。ご助言、ご協力いただきました細胞間情報学講座の円谷徹之博士、下里裕子博士、植田多鶴氏、佐藤寛子氏、杉田英恵氏、市川ひとみ氏、およびみなさまに感謝いたします。最後に御自身の研究よりも私の将来を優先され、修士課程に在学中にもかかわらず本研究を始めることを許していただいた静岡大学教授衛藤英男先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- Abel, S. and Theologis, A. (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* **5**, 421-427.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gómez-Gómez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Asakawa, S., Abe, I., Kudoh, Y., Kishi, N., Wang, Y., Kubota, R., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S., and Shimizu, N. (1997). Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* **191**, 69-79.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M. J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 354-358.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.
- Bower, M. S., Matias, D. D., Carvalho, E. F., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S. J., and Goring, D. R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* *S* locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**, 1641-1650.
- Casselmann, A. L., Vreblow, J., Conner, J. A., Singhal, A., Giovannoni, J., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (2000). Determining the physical limits of the *Brassica* *S* locus by recombinational analysis. *Plant Cell* **12**, 23-33.
- Cabrillac, D., Cock, J. M., Dumas, C., and Gaude, T. (2001). The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**, 220-223.
- Cadwallader, K. A., Paterson, H., Macdonald, S. G., and Hancock, J. F. (1994). N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol. Cell Biol.* **14**, 4722-4730.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. (1993). *CLAVATA1*, a regulator of

meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.

Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.

Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M. (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.

Clark, S. E. (2001). Meristems: start your signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 28-32.

Cohen, P. and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 769-776.

Domínguez, D., Montserrat-Sentís, B., Virgós-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Francí, C., and de Herreros, A. G. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the Snail transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5078-5089.

Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.

Fujita, H., Takemura, M., Tani, E., Nemoto, K., Yokota, A., and Kohchi, T. (2003). An *Arabidopsis* MADS-box protein, AGL24, is specifically bound to and phosphorylated by meristematic receptor-kinase (MRLK). *Plant Cell Physiol.* **44**, 735-742.

Fukai, E., Nishio, T., and Nasrallah, M. E. (2001). Molecular genetic analysis of the candidate gene for *MOD*, a locus required for self-incompatibility in *Brassica rapa*. *Mol. Gen. Genet.* **265**, 519-525.

Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 277-284.

- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2000). FLS2: A LRR receptor-like kinase involved in recognition of the flagellin elicitor in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**, 1-20.
- Gómez-Gómez, L., Bauer, Z., and Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **13**, 1155-1163.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D. D., and Goring, D. R. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 382-387.
- Hardie, D. G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 97-131.
- He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., and Wang, Z. Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10185-10190.
- Hinata, K., Okazaki, K., and Nishio, T. (1983). Gene analysis of self-compatibility in *Brassica campestris* var. *yellow sarson* (a case of recessive epistatic modifier). *Proceedings of the 6th International Rapeseed Conference* **1**, 354-359.
- Hirayama, T. and Oka, A. (1992). Novel protein kinase of *Arabidopsis thaliana* (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine, and threonine. *Plant Mol. Biol.* **20**, 653-662.
- Huse, M. and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
- Hwang, I. and Goodman, H. M. (1995). An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* **8**, 37-43.
- Ikeda, S., Nasrallah, J. B., Dixit, R., Preiss, S., and Nasrallah, M. E. (1997). An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* **276**, 1564-1566.
- Inglés-Esteve, J., Espinosa, L., Milner, L. A., Caelles, C., and Bigas, A. (2001).

Phosphorylation of Ser²⁰⁷⁸ modulates the Notch2 function in 32D cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 44873-44880.

Isogai, A., Takayama, S., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Shinozawa, H., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1987). *S*-locus specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Plant Cell Physiol.* **28**, 1279-1291.

Ito, T., Takahashi, N., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). A serine/threonine protein kinase gene isolated by an in vivo binding procedure using the *Arabidopsis* floral homeotic gene product, AGAMOUS. *Plant Cell Physiol.* **38**, 248-258.

Ito, Y., Hirochika, H., and Kurata, N. (2002). Organ-specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene* **288**, 41-47.

Jeong, S., Trotochaud, A. E., and Clark, S. E. (1999). The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.

Kachroo, A., Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (2001). Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* **293**, 1824-1826.

Kandasamy, M. K., Paolillo, D. J., Faraday, C. D., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1989). The *S*-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.* **134**, 462-472.

Kawai, H., Kanegae, T., Christensen, S., Kiyosue, T., Sato, Y., Imaizumi, T., Kadota, A., and Wada, M. (2003). Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.

Kayes, J. M. and Clark, S. E. (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-3851.

Kho, Y. O. and Bear, J. (1968). Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**, 298-302.

- Kim, M., Cho, H. S., Kim, D.-M., Lee, J. H., and Pai, H. S. (2003). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* **1651**, 50-59.
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J., and Schulze-Lefert, P. (2002). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* **416**, 447-450.
- Kishi-Nishizawa, N. A., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K., Yamakawa, S., Shojima, S., and Suzuki, A. (1990). Ultrastructure of papillar cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid-freezing and substitution-fixation method. *Plant Cell Physiol.* **31**, 1207-1219.
- Kochetov, A. V., Sirmik, O. A., Rogosin, I. B., Glazko, G. V., Komarova, M. L., and Shumny, V. K. (2002). Contextual features of higher plant mRNA 5'-untranslated regions. *Mol. Biol.* **36**, 510-516.
- Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**, 172-175.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8125-8137.
- Kurten, R. C., Cadena, D. L., and Gill, D. N. (1996). Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* **272**, 1008-1010.
- Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (2001). Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the *S* locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell* **13**, 627-643.
- Larsson, C., Widell, S., and Kjellbom, P. (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. *Meth. Enzymol.* **148**, 558-568.
- Lawton, M. A., Dean, S. M., Dron, M., Kooter, J. M., Kragh, K. M., Harrison, M. J., Yu, L., Tanguay, L., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. (1991). Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. *Plant*

Mol Biol. **16**, 235-49.

Li, J. and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.

Li, J. and Nam, K. H. (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* **295**, 1299-1301.

Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., and Walker, J. C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213-222.

Llompart, B., Castells, E., Rio, A., Roca, R., Ferrando, A., Stiefel, V., Puigdomenech, P., and Casacuberta, J. M. (2003). The direct activation of MIK, a germinal center kinase (GCK)-like kinase, by MARK, a maize atypical receptor kinase, suggests a new mechanism for signaling through kinase dead-receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 48105-48111.

Marin-Olivier, M., Chevalier, T., Fobis-Loisy, I., Dumas, C., and Gaude, T. (2000). Aquaporin *PIP* genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica oleracea*. *PlantJ.* **24**, 231-240.

Martin, N., Jaubert, J., Gounon, P., Salido, E., Hasse, G., Szatanik, M., and Guenet, J.-L. (2002). A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy mice. *Nature Genet.* **32**, 443-447.

McCubbin, A. G. and Kao, T.-H. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 333-364.

McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 272-276.

Michelmore, R. W., Paran, I., and Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9828-9832.

Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**, 332-336.

Moran, T. V. and Walker, J. C. (1993). Molecular cloning of two novel protein kinase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **1216**, 9-14.

Morris, D. R. and Geballe, A. P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8635-8642.

Morris, E. and Walker J. C. (2003). Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 339-342.

Nam, K. H. and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203-212.

Nasrallah, J. B., Kao, T.-H., Chen, C.-H., Goldberg, M. L., and Nasrallah, M. E. (1987). Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the *S*-locus of *Brassica oleracea*. *Nature* **326**, 617-619.

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.

Nisho, T. and Hinata, K. (1977). Analysis of *S*-specific proteins in stigmas of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity* **38**, 391-396.

Sadowski, J., Gaubier, P., Delseny, M., and Quiros, C. F. (1996). Genetic and physical mapping in *Brassica* diploid species of a gene cluster defined in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 298-306.

San José, E., Benguria, A., Geller, P., and Villalobo, A. (1992). Calmodulin inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15237-15245.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K., Jürgens, G., and Laux, T. (2000). The stem

cell population of *Arabidopsis* shoot meristem is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.

Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700.

Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in Wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 647-654.

Seitz, C., Müller, P., Krieg, R. C., Männel, D. N., and Hehlhans, T. (2001). A novel p75TNF receptor isoform mediating NFκB activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 19390-19395.

Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., and Innes, R. W. (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.

Shiba, H., Hinata, K., Suzuki, A., and Isogai, A. (1995). Breakdown of self-incompatibility in *Brassica* by the antisense RNA of the *SLG* gene. *Proc. Japan Aca.* **71**, 81-83.

Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., Che, F.-H., Suzuki, G., Watanabe, M., Hinata, K., and Isogai, A. (2001). A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* **125**, 2095-2103.

Shiba, H., Kenmochi, M., Sugihara, M., Iwano, M., Kawasaki, S., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2003). Genomic organization of the *S*-locus region of *Brassica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 622-626.

Shiu, S.-H. and Bleecker, A. B. (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10763-10768.

Skirpan, A. L., McCubbin, A. G., Ishimizu, T., Wang, X., Hu, Y., Dowd, P. E., Ma, H., and Kao, T.-H. (2001). Isolation and characterization of kinase interacting protein 1, a pollen protein that interacts with the kinase domain of PRK1, a receptor-like kinase of petunia. *Plant*

Physiol. **126**, 1480-1492.

Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8816-8820.

Stone, J. M., Collinge, M. A., Smith, R. D., Horn, M. A., and Walker, J. C. (1994). Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine/threonine receptor kinase. *Science* **266**, 793-795.

Stone, S. L., Arnoldo, M., and Goring, D. R. (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**, 1729-1731.

Stone, S. L., Anderson, E. M., Mullen, R. T., and Goring, D. R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* **15**, 885-898.

Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., and Hinata, K. (1999). Genetic organization of the *S* locus: identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* **153**, 391-400.

Swiderski, M. R. and Innes, R. W. (2001). The *Arabidopsis PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J.* **26**, 101-112.

Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., and Suzuki, A. (1987). Sequences of *S*-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* **326**, 102-104.

Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., and Isogai, A. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1920-1925.

Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Iwano, M., and Isogai, A. (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-

incompatibility. *Nature* **413**, 534-538.

Takayama, S. and Sakagami, Y. (2002). Peptide signalling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 382-387.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Ojima, k., Watanabe, M., Toriyama, K., and Hinata, K. (1997). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L. *Breeding Sci.* **47**, 127-134.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K. (2000). The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* **403**, 913-916.

Thomas, S. M. and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 513-609.

Thompson Jr, G. A. and Okuyama, H. (2000). Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lipid Res.* **39**, 19-39.

Torii, K. U. (2000). Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 361-367.

Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., and Clark, S. E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signalling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-405.

Vanoosthuyse, V., Tichtinsky, G., Dumas, C., Gaude, T., and Cock, J. M. (2003). Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* *S* locus receptor kinase. *Plant Physiol.* **133**, 919-929.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* **23**, 4407-4414.

Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S.,

Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* **2**, 505-513.

Williams, R. W., Wilson, J. M., and Meyerowitz, E. M. (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10467-10472.

Willis, A. E. (1999). Translational control of growth factor and proto-oncogene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 73-86.

Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181-191.

Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E., and Li, J. (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* **130**, 1221-1229.