

(総説)

## 自家不和合性研究の最近の動向 — 分子遺伝学的研究を中心にして — (I)

渡辺 正夫・日向 康吉

東北大学農学部植物育種学研究室  
〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1  
(1994年4月27日受理)

### Trends in the Research of Self-incompatibility (I)

Masao WATANABE and Kokichi HINATA

Laboratory of Plant Breeding,  
Faculty of Agriculture, Tohoku University  
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981, Japan.

Many plants in Angiosperms have self-incompatibility, by which they can recognize self or non-self mating and fertilize with non-self pollen to keep genetical diversity. Recent advance of molecular genetics enabled to clone the genes associated with self-incompatibility in both gametophytic and sporophytic systems of homomorphic type. In gametophytic self-incompatibility of Solanaceae, probably and Rosaceae, several evidences indicate that the recognition reaction is controlled by the action of *S*-RNase in the pistil, though any specific substance in pollen was not determined yet. In *Papaver*, however, the stigmatic substance is different from RNase. In sporophytic self-incompatibility of Brassicaceae, secreted protein named *SLG* and membrane bound protein *SRK*, a kind of protein kinase, play an important role in the recognition reactions. This implicates that a protein phosphorylation cascade is important in the signal transduction in plants.

Key words : Recognition reaction, Self-incompatibility, Signal transduction, S-receptor kinase (*SRK*), *S*-RNase.

#### I. はじめに

被子植物の多くはひとつの花の中に雄しべと雌しべの両方がある両性花を持っている。両性花では、同じ花の雌しべと雄しべが近くにあるので自家受粉しやすく、子孫の確保という点からは合理的である。しかし

ながら、強度な近親交配という問題が生じる。そこで、自家不和合性や雌雄の成熟時期がずれる雌雄異熟などの機能を発達させることによって、この近親交配を避けるようにしている。植物は、この様な近親交配を妨げる機構と受精し易い機構を同時に兼ね備え、バランスをとりながら子孫を残しているようである。

自家不和合性とは、雌雄の生殖器官が正常なのに、受粉から受精に至る過程で、自・他の花粉管を認識し、自己の花粉伸長を阻害して自家受精しない性質である。従って、他の植物体の花粉で受精して子孫を残すことになり、近親交配が妨げられる。このような性質はダーウィン以前にも知られていたが、ダーウィンが詳細な観察をして以来多くの注目を浴びてきた。特に興味を持たれた点は、自家不和合性には、動物の抗原・抗体反応にも匹敵する自己と非自己の認識反応が含まれていることであった。さらにナス科やアブラナ科植物はそれぞれ同じ形の花を持つが、認識反応は1遺伝子座のS複対立遺伝子系 ( $S^1, S^2, \dots, S^n$ ) で説明出来ることが分かった。雌しべと花粉のS遺伝子の表現型が同じときに不和合となる。1座位に100を越すS複対立遺伝子が存在し、それが細胞間認識に関わっているという単純な図式は、研究者の興味をおおいにそそった。さらに、このS遺伝子と行動を共にするタンパク質やDNAクローンが単離されたので、分子生物学の絶好のターゲットとなった。

自家不和合性は花粉と雌しべとの反応である。雌しべは被子植物に進化した時に、心皮から形成されたものなので、この性質は被子植物特有のものである。そして、この性質は両性花に特有のものである。雌雄異花や雌雄異株のものでは、それ自体が近親交配を妨げる機構なので、自家不和合性を持っていない。高等植物では雌雄異花や雌雄異株の植物は少数派であり、70%位のものが両性花を持っている。半数以上の被子植物が異型花あるいは同型花の自家不和合性を有しているといわれている<sup>(1, 2)</sup>。

本総説では、はじめに、自家不和合性の表現型による分類とその特徴について簡単に説明する。次に、配偶体型自家不和合性と胞子体型自家不和合性について最近の研究を説明することにする。ただし、本総説の掲載が2回に分れるので、本号では、分類と配偶体型自家不和合性について説明し、次号で胞子体型自家不和合性について説明することにする。また、引用文献をそれぞれの掲載の最後書き添えた。

## II. 自家不和合性の分類

自家不和合性は、同形花型自家不和合性と異型花型自家不和合性に分けられる(図1)。異形花型自家不和合性には、2形花型のものと3形花型の2種類ある。2形花型に属するものの代表的なものとして、サクラソウ(サクラソウ科)やソバ(タデ科)などがあげら

れる。2形花型のものでは、集団が短花柱花(thrum)と長花柱花(pin)の個体から構成されており、短花柱花は長花柱花の花粉によってのみ受精し、長花柱花は短花柱花から生じた花粉によって受精する。花粉管が雌しべ花柱内を伸長する間に、花粉管の識別が起こり、同じ型の花粉では受精が抑制される。交配実験から、花の型は1遺伝子座の対立遺伝子によって支配されていると推定され、短花柱花の遺伝子型はSsで、長花柱花の遺伝子型はssと考えられている。長花柱花と短花柱花で花粉粒や柱頭細胞の大きさが違うことが観察されていたが、最近の研究では、南国の果樹スターフルーツ(*Averrhoa carambola*: グレンシともいう)についての観察でも同様なことが見られ、また長花柱花と短花柱花のめしべや葯のタンパク質の違いも検出されている<sup>(3, 4)</sup>。このように、異形花型の自家不和合性は形態と不和合性の表現型が関連していることから、分子遺伝学の良い材料になることが期待されるが、まだ十分な研究は行われていないようである。

同型花自家不和合性はS遺伝子の挙動から胞子体型と配偶体型に分けられる(図1)。胞子体型自家不和合性においては、花粉の認識行動が花粉を生み出した胞子体(親植物)の遺伝子(正確には表現型)によって決定される。一般的にいて、この型の植物では雌しべ先端の柱頭表面に粘液物が少なく(dry stigma)、受粉時の花粉は2つの生殖細胞と1つの栄養細胞から構成され、3細胞性である。自家受粉花粉は発芽しなかったり、あるいは発芽しても花粉管が柱頭に侵入できない。アブラナ科、キク科、ヒルガオ科の植物がこの型の不和合性をもつ(図2A)。

ナス科、バラ科、マメ科、ケシ科、イネ科、ユリ科の植物は配偶体型の自家不和合性を示す。この型の自家不和合性においては、花粉の行動は花粉自身(配偶体)のS遺伝子によって支配される。雌しべは2倍体で2つの対立遺伝子を持つが、対立遺伝子は共優性で、両方の性質を示す。この種の植物の多くは、柱頭表面が粘液性のもので覆われており(wet stigma)、花粉は柱頭表面の粘液の中に入って発芽する。自家受粉の場合には、花粉管は花柱内で伸長を停止する。この型の自家不和合性は、植物界に広く分布し、花粉管伸長が柱頭で停止するものとか、2座位の遺伝子が関与するものとか、変異が大きい。受粉時の花粉は一般に1生殖細胞と1栄養細胞からできており、2細胞性である(図2B)。

もっとも、このような形態との関連には例外も多く、

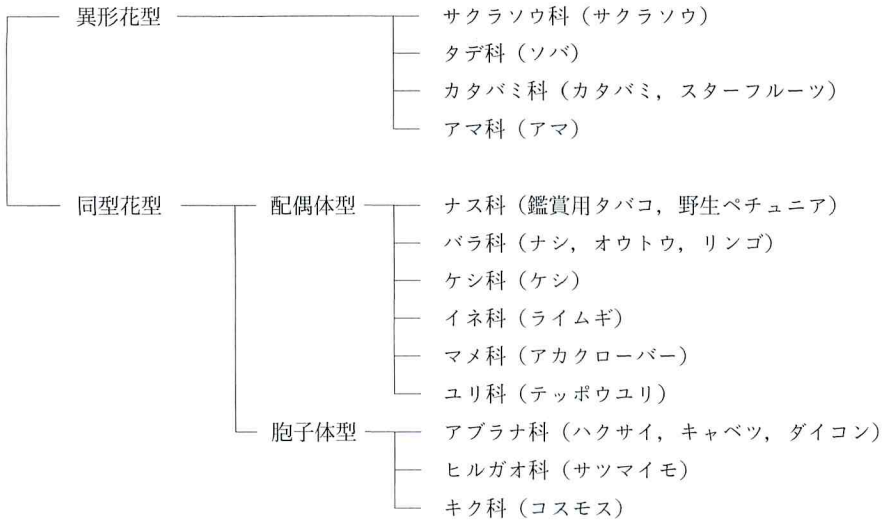
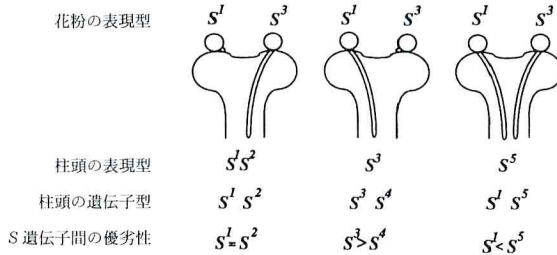


図1 自家不和合性の分類と植物の例

**A**



**B**

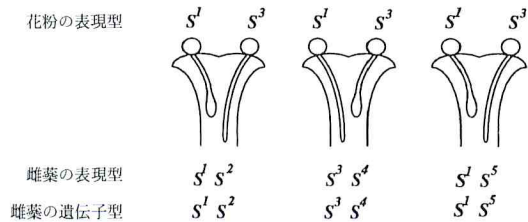


図2 孢子体型自家不和合性 (A) と配偶体型自家不和合性 (B) の遺伝子型と表現型の関係を示す模式図

- (A) 孢子体型の場合、S 遺伝子の優性・劣性の関係は花粉と柱頭必ずしも一致しない。ここでは便宜的に  $S^1$ ,  $S^3$  の表現型を持った花粉を交配したときについて示したため、それぞれの花粉の遺伝子型は表現型とは必ずしも一致しない。
- (B) 配偶体型の場合、雌蕊では S 対立遺伝子において共優性を示す。花粉では、遺伝子型と表現型とが同じになるが、ここでは便宜的に  $S^1$ ,  $S^3$  の表現型 (遺伝子型) を持った花粉を交配したときについて示した。

例えばイネ科では2座位の遺伝子が関与し、受粉時の花粉も3細胞である。研究が進めば例外は更に多くなるかも知れない。自家不和合性の性質は科単位で違う可能性もあるので、ここでは科単位で考察したい。

伝統的に、自家不和合性のS複対立遺伝子は対立遺伝子を示す数字を下付けにしている。しかし、複対立遺伝子の数字は上付けにするように提案されているので、ここでは上付けで記した。なお、近年この分野における総説が数多く書かれているので参考にして頂きたい<sup>(5-15)</sup>。

### III. 配偶体型自家不和合性

#### i) ナス科 (Solanaceae) 植物の自家不和合性

East and Mangelsdorf (1925)<sup>(16)</sup> によってタバコ属の遺伝的研究がなされて以来、配偶体型自家不和合性については広範な知見が蓄積されてきた。タバコ属、ペチュニア属、ナス属、トマト属などのナス科の植物について、最近の研究展開が著しい。配偶体型の不和合性においては、減数分裂後の花粉(配偶体)の遺伝子が働くと考えられる。例えば、S<sup>1</sup>S<sup>2</sup>植物体の花粉にはS<sup>1</sup>の性質を持つ花粉とS<sup>2</sup>の性質の花粉とが混じっているが、それぞれの花粉がS<sup>1</sup>、あるいはS<sup>2</sup>の性質を示す。雌しべ側は2倍体であるが、S対立遺伝子の関係は共優性で、S遺伝子がヘテロ接合の時には両遺伝子の性質を示す。花粉粒のS遺伝子と雌しべのS遺伝子のナンバーが一致したときに、花柱内における花粉管の伸長が阻害される。この時、花粉管の先端のベシクル生産が異常になり、花粉管の先端が肥大し、最終的には花粉管が破裂する<sup>(1, 2)</sup>。

#### (1) S-RNase

交配実験においてS遺伝子と行動を共にする花柱側のタンパク質として、S糖タンパク質がナス科のいろいろな属(*Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*)の植物において同定された。この糖タンパク質は、塩基性のタンパク質で、その分子量は26kDa-39kDaの範囲にあり、等電点は6.2-9.5の範囲であった<sup>(13)</sup>。

崎山らは、*Aspergillus oryzae* や *Rhizopus niveus* のRNaseを調べている過程において、そのヒスチジン部位が、タバコ属のS糖タンパク質のアミノ酸配列と一致していることに気が付いた<sup>(17)</sup>。このことが引金となって、この糖タンパク質の機能が調べられ、確かにRNase活性があることが分かった。このことからナス科のS糖タンパク質はS-RNaseと

呼ばれるようになった。自家和合性のタバコ(*Nicotiana tabacum*)と不和合性の野生種(*Nicotiana glauca*)と比較すると雌しべのRNase活性には100-1000倍の差があった。S-RNaseの活性はS遺伝子型によって大きく異なっている<sup>(18)</sup>。そして、*in vivo*の状態でも、確かに花粉のRNAが不和合受粉の時に特異的に分解されることが分かった<sup>(19)</sup>。その時にS遺伝子の特異性はどの様にして決まるかが問題となる。確かに、S-RNaseは花粉管に取り込まれ、RNAが分解されているようであるが、その特異性がどうして生じるのか、まだ分かっていない<sup>(20)</sup>。*in vitro*の花粉発芽実験でも、特異性がある場合と、はっきりしない場合がある<sup>(21)</sup>。ペチュニア(*Petunia hybrida*, *Petunia inflata*)のS-RNaseについてもRNase活性が調べられ、活性があることが確かめられている<sup>(22-24)</sup>。S-RNaseの発現量は、柱頭と花柱で大きく異なるが、その活性は同程度である。柱頭と花柱で発現しているS-RNaseはタンパク質レベルでは、何の違いも見られないが、転写産物であるmRNAにおいては、花柱の転写産物の方が70-100ntほど柱頭のものよりも長い。これは、poly(A)の長さに起因するようであり、転写産物の安定性に寄与していると考えられる<sup>(25)</sup>。ペチュニア(*Petunia inflata*)のS-RNaseを組みこんだバキュロウイルスで発現させたS-RNaseは糖鎖の有無に関わらず、RNase活性を示した<sup>(26)</sup>。これらのことから、本論ではナス科のS糖タンパク質をS-RNaseと呼ぶことにする。

なお、ペチュニア(*Petunia inflata*)の花柱cDNAライブラリーからS遺伝子と連鎖していないRNaseの遺伝子が単離されている。このRNaseは他のS-RNaseと42%から71%の相同性を示すが、その進化的関係は明らかではない。生物的機能としては、病原菌に対する抵抗性や老化との関係が考えられている<sup>(27)</sup>。このことからすると、花柱には何種類かのRNaseがあるが、その中のあるものがS-RNaseとして働いているようである。

S-RNase(*Nicotiana glauca*)の抗体を用いた実験から、タバコ属ではS-RNaseが柱頭の細胞間隙や花柱の誘導組織や胎座表皮の細胞壁に存在していた<sup>(28)</sup>。この物質は花柱の下部になるに従ってだんだんと少なくなり、子房には全く検出されない。また、蕾よりも開花した花の花柱により多く含まれている<sup>(29-31)</sup>。*In situ hybridization*実験からS-RNaseのmRNAは柱頭と花粉管の通る分泌組織において

発現し、雌しべの他の組織にはなかった。蕾においては柱頭の表面にのみ発現が認められた<sup>(32)</sup>。この様に S-RNase の発現場所は花柱内の花粉管の通り道であり、転写産物と翻訳産物のいずれでも同じ結果である。以上のことから、S-RNase の発現部位は、花粉管の停止する場所と一致しており、このことから、自家不和合性に関与していることが考えられる。

S-RNase 間には糖鎖の数に差がある。糖鎖はアスパラギン結合型であり、マンノースを多く含んでいるかハイブリッド型である<sup>(22, 33)</sup>。単離・精製した糖鎖から、S-RNase には、4つの構造的に異なった糖鎖があることが示された。さらに、その構造は孢子体型の自家不和合性を示す *Brassica campestris* の *SLG* (後述) について決定されてあった糖鎖の構造とは異なっていたが、S 遺伝子間では違いが見られなかった。糖鎖の付く位置に対して、これら異なった糖鎖が S 遺伝子間で異なっているとすれば、糖鎖も S-RNase の構造と機能に対して何らかの役割を果たしていることが考えられる<sup>(34)</sup>。

ナス科のタバコ属<sup>(28, 35, 36)</sup>、ペチュニア属<sup>(24, 30, 37)</sup>、ナス属<sup>(38, 39)</sup>、トマト属<sup>(40, 41)</sup>において、20の S-RNase の塩基配列が決定されている。タバコ属では7つの S 遺伝子から S-RNase の cDNA がクローニングされ、塩基配列が決定された。S-RNase は200あまりのアミノ酸残基からできている。タンパク質間には平均53.8%の相同性があるが、7つの S-RNase は相同性によって、2つのグループに分けられる。アミノ末端に保存性のよい疎水性の配列があり、60のアミノ酸残基が完全に保存され、その中には9つのシステイン残基も含まれていた。3種10の S-RNase を比較すると、46のアミノ酸残基が保存され、そこには8ないし10のシステイン残基が含まれており、タンパク質の高次構造と関係しているようである。超変異部位は、第60のアミノ酸のあたりである<sup>(28, 35, 42)</sup>。別の調査では、11の S-RNase について調べた結果、アミノ酸配列のホモロジーは40%程度であり、種内よりも種間でホモロジーが高い場合もあった<sup>(43)</sup>。19の変異部分があり、その内の12はクラスターになって2箇所に分かれる<sup>(44)</sup>。種間で多型的なところでは、非同義的置換が多い<sup>(45)</sup>。可変領域を構成する144のアミノ酸残基のうち50残基が超可変領域を構成していた。S-RNase の全体に分散する形で、5つの保存領域と5つの超可変領域と多くの可変領域がクラスターを構成していた<sup>(36)</sup>。19の S-RNase の相同性を計算すると38.74%から93.74%に変異して

いた。異なった属間の S-RNase とその周辺領域 (flanking region) の比較から、新しい S 対立遺伝子は、組換えによって生じると言うよりはむしろ、対立遺伝子の特異性 (allelic specificity) を決定する部位での点突然変異の蓄積によって生じていると考えられる<sup>(41, 46)</sup>。種内における相同性よりも、種間における相同性の方が低い場合があることから、ナス科の種の分化よりも S-RNase の分化の方が古いのではないかと考えられる。

一方、S-RNase に関連した花粉側の物質に関しては幾つかの対立する報告が出ている。1952年に Lewis によってマツヨイグサを用い、S 特異物質の存在が示唆されてはいるが<sup>(47)</sup>、S-RNase の cDNA とハイブリッドするのは薬や発芽した花粉においては検出されていない<sup>(37, 42)</sup>。その後の別の実験において、非常に弱いながらも薬において花柱のものよりわずかに短い S-RNase の転写産物が Northern 分析と PCR によって検出された。この薬での転写産物は花柱で発現している S-RNase と同じ遺伝子由来のものであった。また、S-RNase に対する抗体を使った *in situ* 分析から、S-RNase は花粉のインチン (intine) の内側に局在し、花粉を生じる孢子体組織には存在しなかった<sup>(48)</sup>。この花粉で発現している S-RNase の機能や自家不和合性との関連は明らかになっていない。

S-RNase のゲノムクローンも幾つかの種において単離されており、S-RNase の遺伝子は2つのエクソンからなり、イントロンの大きさは100bp前後である<sup>(39, 46, 49)</sup>。イントロンと flanking region は対立遺伝子間で大きく変異している。しかし、転写開始点の上流に転写制御に関連していると思われる配列が存在し、そうした転写制御因子と思われる配列とイントロンの挿入位置は、異なった属間においても相同性が見られる。S-RNase の flanking region は多くの繰り返り配列から構成されており、対立遺伝子間で大きく異なっている。このことは、染色体上のこの領域が何らかの機構で組換えが抑制されていることによるものと考えられている<sup>(46)</sup>。

多くの制限酵素切断パターンが1つのフラグメントを生じるので、S-RNase のコピー数は1だろうと考えられる<sup>(28, 46)</sup>。ジャガイモの S-RNase (*Sr 1*) をプローブにして、RFLP 上にマップすると第1染色体上に位置していた。このことは以前にトマトの野生種 *Lycopersicon peruvianum* で S 遺伝子があるとされていた染色体上の位置と一致していた<sup>(50, 51)</sup>。

## (2) 形質転換実験

ここまで説明してきた S-RNase が直接、自家不和合性に関連しているかどうかを証明する 1 つの方法として、遺伝子導入植物を作出してその表現型の変化を見る方法がある。自家不和合性系統である *Nicotiana glauca* の形質転換は困難であるので<sup>(52)</sup>、*Nicotiana glauca* の S-RNase を自家和合種である *Nicotiana glauca* に形質転換が行われた。S-RNase のプロモーターを使うと *Nicotiana glauca* において発現が全く観察されないの、CaMV 35S プロモーターに S-RNase の cDNA あるいはゲノム DNA を連結したものを形質転換している。器官特異性が比較的にないと言われるこのプロモーターを使ったにも関わらず、形質転換体において S-RNase は成熟した花器官で特に強く発現が観察された。形質転換体での S-RNase と遺伝子供与体である *Nicotiana glauca* の S-RNase は、その発現部位、RNase 活性、糖鎖の数において何ら違いが見られなかったが、発現量は形質転換体の方が *Nicotiana glauca* に比べて 100 倍以上少なかった。また、この形質転換体は自家和合性のままであった<sup>(49)</sup>。

それに対して、 $S^3$ -RNase のプロモーターに  $S^3$ -RNase の cDNA をアンチセンスの方向につないだものを  $S^2$   $S^3$  遺伝子型の *Petunia inflata* に形質転換したところ、形質転換体の花柱で、 $S^3$  花粉だけの侵入が見られる個体と  $S^2$ ,  $S^3$  の両方の花粉の侵入が見られる形質転換体を得られた。それぞれの形質転換体において、侵入の見られる遺伝子型の S-RNase の発現が特異的に抑制されていることが転写産物とタンパク質レベルで観察された。また、 $S^1$   $S^2$  個体に  $S^3$ -RNase のゲノム遺伝子を形質転換した個体において、 $S^3$  の花粉が侵入できないものが現れた。この形質転換実験において、自家不和合性の表現型の変化は花柱側でのみ見られ、花粉側の表現型には何ら影響を与えなかった。このことは、S-RNase が自家不和合性の表現型に直接関係していることを証明した初めての実験である<sup>(53)</sup>。

同様の実験が、花柱特異的に発現するトマトのキチナーゼ遺伝子のプロモーターに S-RNase のゲノム遺伝子を連結したものを、*Nicotiana glauca* と *Nicotiana langsdorffii* の雑種に形質転換することによって示されている<sup>(54)</sup>。これら 2 つの実験から、S-RNase が、自家不和合性の認識反応において、花柱側で重要な役割を果たしていることが直接明らかになった。

### (3) 自家和合性系統を用いた分析

自家和合性の *Petunia hybrida* から、S-RNase の遺伝子が取られている。この S-RNase は交配実験によって、S 遺伝子と行動を共にし、RNase 活性があることが示されている<sup>(54, 55)</sup>。このことは、S 遺伝子座上の S-RNase 以外の部分において、突然変異がおきているのではないかと考えられる。

それに対して、野生トマト (*Lycopersicon peruvianum*) の自家和合性個体を用いた分析によると、この自家和合性は S 遺伝子座における突然変異によって生じたものであった。この S-RNase は、RNase 活性を失っており、その原因として保存領域 C2 において、RNase の活性に必須とされているヒスチジンがアスパラギンに変異していた。このことから、この和合性への突然変異は S-RNase の不活性型への変化を伴っており、自家不和合性反応に S-RNase が関与していることを裏付けているものである<sup>(56)</sup>。このことから、ナス科の自家不和合性においては、花柱での S-RNase が重要な役割をしていることが考えられる。

#### ii) バラ科 (Rosaceae) の S-RNase

ナシの花柱タンパク質を等電電気泳動で分離し S 遺伝子に対応するタンパク質の分析が行われ、特定の S 遺伝子に対応するタンパク質のバンドが検出されていた<sup>(57)</sup>。

最近、バラ科のナシ、リンゴにおいても S 遺伝子と共に遺伝する RNase アイソザイムの存在が示唆されている<sup>(58, 59)</sup>。2 次元電気泳動分析から、この RNase は、ナス科のものと同じように、糖鎖を有しており、そのアミノ末端のアミノ酸配列も決定されている。その結果、ナス科の S-RNase と高い相同性を示していた。このタンパク質の発現は、花柱と子房に限られていた<sup>(60, 61)</sup>。こうしたことから、バラ科植物の自家不和合性はナス科のもの機構と類似している可能性が考えられる。

#### iii) ケシ科 (Papaveraceae) 植物の自家不和合性

ヒナゲシ (*Papaver rhoeas*) の自家不和合性は、他の配偶体型の自家不和合性とは異なり、自家受粉した花粉管は柱頭表面で伸長が阻害される。そこで、*in vitro* での花粉発芽培地を用いたバイオアッセイ法を用いて、S 特異物質が柱頭抽出物から分離された。これは特異物質の機能に注目して単離した最初の実験例である。この物質も糖タンパク質であり、分子量は 22kDa であり、等電点は 7.4-8.6 であった<sup>(62, 63)</sup>。

また、発芽培地での花粉管伸長と柱頭抽出物との間に対応があり、そのタンパク質が検出されている。こ

のタンパク質を処理した花粉管では、タンパク質の急速なリン酸代謝の存在が示唆された<sup>(64, 65)</sup>。正常な花粉管の伸長には遺伝子の転写を必要としないが、不和合反応の結果として、花粉側の遺伝子の *de novo* 転写が起きているようであった<sup>(66)</sup>。また、発芽培地中に不和合組み合わせの S-タンパク質を添加すると、花粉管において  $Ca^{2+}$  の一時的な上昇が見られるのに対して、和合組み合わせや熱処理した S-タンパク質を添加した場合には、 $Ca^{2+}$  の上昇は見られない。以上の結果から、不和合反応における花粉管の伸長阻害に花粉管内での  $Ca^{2+}$  が second messenger として機能しているようである<sup>(67)</sup>。

最近、この柱頭で発現している S 特異タンパク質が単離され、そのアミノ末端のアミノ酸配列が決定され、その情報を元にその cDNA が単離された。その結果、このタンパク質は他の自家不和合性種において単離されているタンパク質とは全く相同性が見られなかった。また、発現は、柱頭においてのみ観察され、開花前日からその発現が始まり、開花数日後も発現が見られた。サザン分析の結果、この遺伝子はゲノム中に 1 コピーであると考えられた。さらに、大腸菌内で発現させたこのタンパク質には、先に述べたような、S 対立遺伝子特異的に花粉管の伸長を抑制する作用が見られた<sup>(68)</sup>。

この植物では、花粉管が花柱ではなくて柱頭で伸長が阻害されるので、アブラナ科植物類似の機構があるのかもしれない。いずれにせよ、同じ配偶体型に分類されるものでも、ナス科とケシ科では、自家不和合性の機構が異なっていることが示唆される。

iv) ナス科、バラ科以外の植物での RNase の検討  
トマトの培養細胞においてリン酸飢餓状態にしたときに特異的に培養液中に溶出される RNase も単離されている。この RNase には、アスパラギン結合型の糖鎖の付く部位はなく、糖タンパク質ではないと考えられている<sup>(69)</sup>。アブラナ科の自家不和合性種であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においても、RNase が発現していることが、活性染色や PCR 法によって確認され、その遺伝子も単離されている<sup>(70, 71, 72)</sup>。この RNase (*RNS2*) は、トマトの培養細胞の培養液中に溶出してくる RNase と特に高い相同性を示した。またその発現は植物全体で見られるものの、特に花器官とリン酸飢餓状態にしたときに強い発現が見られた。こうしたことから、この *RNS2* の機能として、何らかの点で老化に関与しているものと考えられる<sup>(72)</sup>。

さらに、ウリ科のニガウリ (*Momordica charantia*) の種子からも S-RNase と高い相同性を持った RNase が単離され、そのアミノ酸配列が決定されているが、その機能に関しては明らかになっていない<sup>(73)</sup>。こうした RNase は進化の過程で、S-RNase とはかなり古い時代に分岐し、異なった生理・生化学的機能を持つようになったものと考えられる。

以上配偶体型自家不和合性の研究の概要を紹介したが、ナス科やバラ科では S-RNase が花柱（雌しべ）側の自己・非自己の認識に関与しているものと考えられる。花粉側の特異物質とその認識機構の解明が待たれている。これに反して、ケシ科の認識物質は S-RNase ではないようであり、この点の解明も待たれる。

## 引用文献

- (1) Nettancourt, D. de : "Incompatibility in Angiosperms". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977).
- (2) Richards, A. J. : Plant Breeding Systems. Allen & Unwin, London/Boston/Sydney. (1986).
- (3) Wong, K.C., M.Watanabe and K.Hinata : Protein profiles in pin and thrum floral organs of distylous *Averrhoa carambola* L. *Sex. Plant Reprod.* 7, 107-115 (1994).
- (4) Wong, K.C., M.Watanabe and K.Hinata : Fluorescence and scanning electron microscopic study on self-incompatibility in distylous *Averrhoa carambola* L. *Sex. Plant Reprod.* 7, 116-121 (1994).
- (5) Clarke, A. E. and E. Newbigin : Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annu. Rev. Genet.* 27, 257-279 (1993).
- (6) Dickinson, H. G., M. J. C. Crabbe and T. Gaude : Sporophytic self-incompatibility systems : S gene products. *Inter. Rev. Cytol.* 140, 525-561 (1992).
- (7) Dzelzkalns, V. A., J. B. Nasrallah and M. E. Nasrallah : Cell-cell communication in plants : Self-incompatibility in flower development. *Dev. Biol.* 153, 70-82

- (1992).
- (8) Hinata, K., M. Watanabe, K. Toriyama and A. Isogai : A review of recent studies on homomorphic self-incompatibility. *Inter. Rev. Cytol.* **143**, 257-296 (1993).
- (9) Hinata, K., A. Isogai and K. Isuzugawa : Manipulation of sporophytic self-incompatibility in plant breeding. In "Genetic Control of Self-incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants." (E. G. Williams, R. B. Knox, and A. E. Clarke, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (in press) (1994).
- (10) Matton, D. P., N. Nass, A. E. Clarke and E. Newbigin : Self-incompatibility : How plants avoids illegitimate offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1992-1997 (1994).
- (11) Nasrallah, J. B. and M. E. Nasrallah : Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**, 1325-1335 (1993).
- (12) Newbigin, E., M. A. Anderson and A. E. Clarke : Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**, 1315-1324 (1993).
- (13) Singh, A. and T-H, Kao : Gametophytic self-incompatibility : Biological, molecular genetics, and evolutionary aspects. *Inter. Rev. Cytol.* **140**, 449-483 (1992).
- (14) Thompson, R, D. and H. -H. Kirch : The *S* locus of flowering plants : When self-rejection is self-interest. *Trend. Genet.* **8**, 381-387 (1992).
- (15) Trick, M. and P. Heizmann : Sporophytic self-incompatibility systems : *Brassica* *S* gene family. *Inter. Rev. Cytol.* **140**, 485-524 (1992).
- (16) East, E. M. and A. J. Mangelsdorf : A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **11**, 166-171 (1925).
- (17) Kawata, Y., F. Sakiyama, F. Hayashi and Y. Kyogoku : Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T<sub>2</sub> from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **176**, 683-697 (1990).
- (18) McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama and A. E. Clarke : Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957 (1989).
- (19) McClure, B. A., J. E. Gray, M. A. Anderson and A. E. Clarke : Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**, 757-760 (1990).
- (20) Gray, J. E., B. A. McClure, I. Bonig, M. A. Anderson and A. E. Clarke : Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. (*S*-RNase) on *in vitro*-grown pollen tubes. *Plant Cell* **3**, 271-283 (1991).
- (21) Jahnen, W., M. Lush and A. E. Clarke : Inhibition of *in vitro* pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **1**, 501-510 (1989).
- (22) Broothaerts, A. J., P. Vanvinckenroye, B. Decock, J. Van Damme and J. C. Vandenbrouck : *Petunia hybrida* *S*-proteins : Ribonuclease activity and the role of their glycan side chains in self-incompatibility. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 258-266 (1991).
- (23) Singh, A., Y. Ai and T-h. Kao : Characterization of ribonuclease activity of three *S*-allele associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiol.* **96**, 61-68 (1991).
- (24) Ai, Y., D. -S. Tsai and T-h. Kao : Cloning and sequencing of cDNAs encoding two *S*-proteins of a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* **19**, 523-528 (1992).
- (25) McClure, B. A., H. Du, Y. -H. Liu and A. E. Clarke : *S*-locus products in *Nicotiana glauca* pistils are subject to organ-specific post-transcriptional processing but not post-translational processing. *Plant Mol. Biol.* **22**, 177-181 (1993).



- (26) Mu, J. and T-h. Kao : Expression of two *S*-ribonucleases of *Petunia inflata* using baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **187**, 299-304 (1992).
- (27) Lee, H-S., A. Singh and T-h. Kao: RNase X 2 , a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with Solanaceous *S* proteins. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1131-1141 (1992).
- (28) Anderson, M. A., G. I. McFaden, R. Bernatzky, A. Atkinson, T. Orpin, H. Dedman, G. Tregear, R. Fernley and A. E. Clarke : Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **1**, 483-491 (1989).
- (29) Mau, S. L., E. G. Williams, A. Atkinson, M. A. Anderson, E. C. Cornish, B. Grego, R. J. Simpson, A. Kheyr-Pour and A. E. Clarke : Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. *Planta* **169**, 184-191 (1986).
- (30) Ai, Y., A. Singh, C. E. Coleman, T. R. Ioerger, A. Kheyr-Pour and T-h. Kao : Self-incompatibility in *Petunia inflata* : Isolation and characterization of cDNAs encoding three *S*-allele-associated proteins. *Sex. Plant Reprod.* **3**, 130-138 (1990).
- (31) Xu, B., P. Grun, A. Kheyr-Pour and T-h. Kao : Identification of pistil-specific proteins associated with three self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense*. *Sex. Plant Reprod.* **3**, 54-60 (1990).
- (32) Cornish, E. C., J. M. Pettitt, I. Boning and A. E. Clarke : Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **326**, 99-102 (1987).
- (33) Woodward, J. R., A. Bacic, W. Jahnen and A. E. Clarke : *N*-linked glycan chains on *S*-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **1**, 511-514 (1989).
- (34) Woodward, J. R., D. Cralk, A. Dell, K. H. Khoo, S. L. A. Munro, A. E. Clarke and A. Bacic : Structural analysis of the *N*-linked glycan chains from a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Glycobiology* **2**, 241-250 (1992).
- (35) Anderson, M. A., E. C. Cornish, S. -L. Mau, E. G. Williams, R. Hoggart, A. Atkinson, I. Bonig, B. Grego, R. Simpson, P. J. Roche, J. D. Haley, J. D. Penschow, H. D. Niall, G. W. Tregear, J. P. Coghlan, R. J. Crawford, A. E. Clarke : Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **321**, 38-44 (1986).
- (36) Kheyr-Pour, A., S. B. Bintrim, T. R. Ioerger, R. Remy, S. A. Hammond and T-h. Kao : Sequence diversity of pistil *S*-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Sex. Plant Reprod.* **3**, 88-97 (1990).
- (37) Clark, K. R., J. J. Okuley, P. D. Collins and T. L. Sims : Sequence variability and developmental expression of *S* alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible petunia. *Plant Cell* **2**, 815-826 (1990).
- (38) Xu, B., J. Mu, D. L. Nevins, P. Grun and T-h. Kao : Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 341-346 (1990).
- (39) Kaufman, H., F. Salamini and R. D. Thompson : Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 457-466 (1991).
- (40) Rivers, B. A., R. Bernatzky, S. J. Robinson and W. Jahnen-Dechent : Molecular diversity at the self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Mol. Gen. Genet.* **238**, 419-427

- (1993).
- (41) Tsai, D. -S., H. S. Lee, L. C. Post, K. M. Krelling and T-h. Kao : Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other Solanaceous S-proteins. *Sex. Plant Reprod.* 5, 256-263 (1992).
- (42) Haring, V., J. E. Gray, B. A. McClure, M. A. Anderson and A. E. Clarke : Self-incompatibility : A self-recognition system in plants. *Science* 250, 937-941 (1990).
- (43) Ioerger, T. R., A. G. Clark and T-h. Kao : Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9732-9735 (1990).
- (44) Ioerger, T. R., J. R. Gohlke, B. Xu and T-h. Kao : Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4, 81-87 (1991).
- (45) Clark, A. G. and T-h. Kao : Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9823-9827 (1991).
- (46) Coleman, C. E. and T-h. Kao : The flanking regions of two *Petunia inflata* S alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. *Plant Mol. Biol.* 18, 725-737 (1992).
- (47) Lewis, D. : Serological reactions of pollen incompatibility substances. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 140, 127-135 (1952).
- (48) Dodds, P. N., I. Bonig, H. Du, M. A. Anderson, E. Newbigin and A. E. Clarke : S-RNase gene of *Nicotiana alata* is expressed in developing pollen. *Plant Cell* 5, 1771-1782 (1993).
- (49) Murfett, J., E. C. Cornish, P. R. Ebert, I. Bonig, B. A. McClure and A. E. Clarke : Expression of a self-incompatibility glycoprotein ( $S^2$ -ribonuclease) from *Nicotiana alata* in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell* 4, 1063-1074 (1992).
- (50) Gebhardt, C. G., E. Ritter, A. Barone, T. Debener, B. Walkemeier, U. Schachtschabel, H. Kaufmann, R. D. Thompson, M. W. Bonierbale, M. W. Ganai, S. D. Tanksley and F. S. Salamini : RFLP maps of potato and their alignment with the homologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83, 49-57 (1991).
- (51) Bernatzky, R. : Genetic mapping and protein product diversity of the self-incompatibility locus in wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Biochem. Genet.* 31, 173-184 (1993).
- (52) Ebert, P. R. and A. E. Clarke : Transformation and regeneration of the self-incompatible species *Nicotiana glauca* Link & Otto. *Plant Mol. Biol.* 14, 815-824 (1990).
- (53) Lee, H. S., S. Huang and T-h. Kao : S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367, 560-563 (1994).
- (54) Murfett, J., T. L. Atherton, B. Mou, C. S. Gasser, B. A. McClure : S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367, 563-566 (1994).
- (55) Ai, Y., E. Kron and T-h. Kao : S-alleles are retained and expressed in a self-incompatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* 230, 353-358 (1991).
- (56) 神山康夫, J. Royo, M. A. Anderson, E. Newbigin, A. E. Clarke : 野生トマト (*L. peruvianum*) における自家不和合性突然変異遺伝子のクローニング. 育種 43 (別 2), 61 (1993).
- (57) Nakanishi, T. M., T. Yamazaki, K. Funadera, H. Tomonaga, T. Ozaki, Y. Kawai, T. Ichii, Y. Sato and A. Kurihara : Isoelectric focusing analysis of stylar proteins associated with self-incompatibility alleles in Japanese pear. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61, 239-248 (1992).
- (58) Sassa, H., H. Hirano and H. Ikehashi :

- Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiol.* 33, 811-814 (1992).
- (59) 間瀬誠子・佐々英徳・平野久・池橋宏 : S糖タンパク質の分析によるリンゴ品種の自家不和合性遺伝子型の同定. 育雑 44 (別1), 305 (1994).
- (60) Sassa, H., H. Hirano and H. Ikehashi : Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Mol. Gen. Genet.* 241, 17-25 (1993).
- (61) 佐々英徳・間瀬誠子・平野久・池橋宏 : リンゴ S糖タンパク質の性質 : RNase 活性, N末端アミノ酸配列, 発現様式. 育雑 44 (別1), 306 (1994).
- (62) Franklin-Tong, V. E., M. J. Lawrence and F. C. H. Franklin : An *in vitro* bioassay for the stigmatic product of the self-incompatibility gene in *Papaver rhoeas* L. *New Phytol.* 110, 109-118 (1988).
- (63) Franklin-Tong, V. E., M. J. Lawrence and F. C. H. Franklin : Characterization of a stigmatic component from *Papaver rhoeas* L. which exhibits the specific activity of a self-incompatibility (S-) gene product. *New Phytol.* 112, 307-315 (1989).
- (64) Franklin-Tong, V. E., M. J. Lawrence and F. C. H. Franklin : Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L. : there is no evidence for the involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant Cell Environ.* 14, 423-429 (1991).
- (65) Franklin-Tong, V. E. and F. C. H. Franklin : Gemetophytic self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L. *Sex. Plant Reprod.* 5, 1-7 (1992).
- (66) Franklin-Tong, V. E., M. J. Lawrence and F. C. H. Franklin : Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L. : inhibition of incompatible pollen is dependent on pollen gene expression. *New Phytol.* 116, 319-324 (1990).
- (67) Franklin-Tong, V. E., J. P. Ride, N. D. Read, A. J. Trewavas and F. C. H. Franklin : The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.* 4, 163-177 (1993).
- (68) Foote, H. C. C., J. P. Ride, V. E. Franklin-Tong, E. A. Walker, M. J. Lawrence, F. C. H. Franklin : Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2265-2269 (1994).
- (69) Jost, W., H. Bak, K. Glund, P. Terpstra and J. J. Beintema : Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur. J. Biochem.* 198, 1-6 (1991).
- (70) Taylor, C. B. and P. J. Green : Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 96, 980-984 (1991).
- (71) Yen, Y. and, P. J. Green : Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 97, 1487-1493 (1991).
- (72) Taylor, C. B., P. A. Bariola, S. B. del-Cardayre, R. T. Raines and P. J. Green : RNS2 : A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5118-5122 (1993).
- (73) Ide, H., M. Kimura, K. Arai and G. Funatsu : The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *FEBS Lett.* 284, 161-164 (1991).

