

## 植物自家不和合性の分子機構と進化

### Molecular mechanism and evolution of self-incompatibility in plants

課題番号：16H06380

高山 誠司（TAKAYAMA SEIJI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



#### 研究の概要

植物が多様性を確保するために獲得してきた多様な「自家不和合性」の分子機構と進化の過程に迫る。特に、1) 「自己」あるいは「非自己」特異的な認識を可能とする認識因子のタンパク質構造基盤、2) 自他認識から花粉拒絶あるいは受容に至るまでの分子機構、3) 多様な自他認識機構が生み出されてきた進化の経緯、の3つの未解決課題を取り上げ、解明を目指す。

研究分野：農芸化学、応用生物化学

キーワード：自家不和合性、植物生化学、生殖、進化

#### 1. 研究開始当初の背景

多くの植物は自家不和合性を有し、自殖を回避して遺伝的多様性を維持している。この自他識別は、*S* 遺伝子座のハプロタイプ ( $S_1, S_2, \dots, S_n$ ) がコードする2種類の認識因子（花粉因子と雌ずい因子）の相互作用を介して行われる。我々は、アブラナ科およびナス科植物が、「自己認識」と「非自己認識」という根本的に異なる自他識別機構を進化させてきたことを明らかにした。

アブラナ科植物では、花粉のリガンド様分子 (SP11) と雌ずいの受容体キナーゼ (SRK) が、同一 *S* ハプロタイプ特異的に相互作用することで「自己」を認識し、雌ずい細胞内に不和合反応を誘起して自己花粉を拒絶する。

一方、ナス科植物では、雌ずいの RNA 分解酵素 (S-RNase) が花粉管の RNA を分解する「細胞毒」として機能するが、花粉管中の F-box 蛋白質群 (SLFs) が免疫系の様に「非自己」S-RNase を分担して無毒化することで非自己花粉が選択的に受け入れられる。

#### 2. 研究の目的

本研究では、こうした発見により浮上した新たな未解決課題の中から、1) 多数の分子の中から自己および非自己特異的な認識を可能とする認識因子の蛋白質構造上の分子基盤解明、2) 自他認識から花粉拒絶あるいは受容に至るまでの分子機構解明、3) 多様な自他認識機構を生み出してきた植物自家不和合性の進化経緯の解明、の3つの課題を取り上げ、解明を目指す。

#### 3. 研究の方法

1) 自己および非自己認識機構の蛋白質構造化学的解明では、これまでに成功していない認識因子 SRK, S-RNase, SLFs の異種細胞での発現系の確立が鍵を握る。2) 自他認識から花粉拒絶あるいは受容に至るまでの分子機構解明では、アブラナ科植物においては雌ずい細胞内の  $Ca^{2+}$  の挙動解析、ナス科植物においては花粉管内での S-RNase の挙動解析が中心となる。3) 自家不和合性の進化過程の解明では、複数の植物種における *S* 遺伝子座の構造の比較解析が中心的手法となる。

#### 4. これまでの成果

1) 自己および非自己認識機構の蛋白質構造化学的解明

アブラナ科の自己認識機構については、一部改変した  $S_8$ -SRK の細胞外領域を昆虫細胞分泌発現系を用いて調製し、化学合成した  $S_8$ -SP11 と強く結合することを ITC 分析により確認した。結晶化・クライオ条件の検討を経て、 $S_8$ -SRK- $S_8$ -SP11 複合体の 2.6 Å 分解能の反射データを取得した。さらに、セレンメチオニンラベル化  $S_8$ -SRK の反射データを取得し、短波長異常分散法により複合体の結晶構造を決定した。 $S_8$ -SRK と  $S_8$ -SP11 は 2:2 で結合した 4 量体を形成しており、 $S_8$ -SP11 が V 字に配向した 2 分子の  $S_8$ -SRK に挟まれる形で結合していた。この構造を基に、6 つの *S* ハプロタイプの SRK と SP11 の構造をホモロジーモデリングにより予測し、MM-GBSA 法による総当たりの結合実験を行ったところ、いずれも同一 *S* ハプロタイプ由来の SRK と SP11

が最も安定な複合体を形成することが示され、自己認識機構の基本が示された。

ナス科植物の非自己認識機構については、ペチュニアの3つの雌ずい因子  $S_5$ -RNase,  $S_9$ -RNase,  $S_{11}$ -RNase の立体構造を、1.8 Å~2.3 Å の分解能で決定することに成功した。超可変領域と呼ばれる部位は特に表面電荷ポテンシャルが異なることが示され、SLFs の非自己特異的認識に関わることが推定された。また、花粉因子については、 $S_9$ -RNase を認識する非自己  $S_5$ -SLF1 と認識できない自己  $S_9$ -SLF1 に着目した部位特異的置換実験を行い、非自己特異的認識に関わるアミノ酸残基を特定した。

## 2) 自己花粉排除および非自己花粉受諾の分子機構解明

アブラナ科植物においては、ゲノム編集実験により、SRK 下流の乳頭細胞内  $Ca^{2+}$  流入に関与するチャンネル分子の特定を進めた。一方、Cl/pH センサーの ClopHensor を導入した植物体の解析から、乳頭細胞内 pH が自家受粉時に特異的に低下することを見出した。 $Ca^{2+}$  チャンネル開口機構解明の新たな手掛かりとなることが期待された。

ナス科植物においては、電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的解析により、花柱を伸長中の花粉管内の S-RNase の挙動を解析した。その結果、自己花粉の伸長抑制が始まる受粉後6時間の段階において、S-RNase が自己花粉管の先端部分に特異的に蓄積していることが示された。また、花粉管由来の mRNA 量が、自己花粉において有意に低下していることが示された。

## 3) 自家不和合性の進化過程の解明

ナス科植物の非自己認識機構では、自己 S-RNase を認識する SLF の獲得あるいは欠失により、自家和合性と自家不和合性の状態を行き来することが可能である。この可逆的な自家和合性状態を介して植物が多様な自家不和合性を獲得したとする新しい進化モデルを提唱した。アブラナ科植物においても、S ハプロタイプ間の優劣性を制御する低分子 RNA が、同様な可逆的自家和合性状態を生み出してきた可能性が推察された。

雌雄異株のアスパラガスを材料に Y 染色体上の雌雄分化因子の探索を行い、MSE1 という転写因子が性決定に関与することを発見した。カキに次いで2番目に同定された因子であるが、両者には共通性はなく、雌雄異株という性表現の収斂進化が示唆された。

隔離されたアブラナ科の同種集団間に認められた一側性の不和合性について原因遺伝子を解析した。その結果、進化の過程で重複した S 遺伝子座の雌雄因子が関与することが判明し、自家不和合性関連因子が生殖隔離・種分化を誘導する可能性が示唆された。

## 5. 今後の計画

1) のアブラナ科植物の自己認識機構についてはシミュレーション構造の実験的検証と SRK 活性化機構の解明を進める。ナス科植物では、SLFs の異種発現系を確立し、SLF-SRNase 複合体の結晶構造解析を目指す。2) のアブラナ科植物の花粉排除機構については、pH 変化、 $Ca^{2+}$  流入に関わる分子の特定を目指す。ナス科植物については、degradome 解析を通じて自己花粉管内の RNA 分解を検証した上で、無毒化機構のモデルを提示する。3) では様々な自家不和合性植物の S 遺伝子座のゲノム解析を継続し、植物における多様な自家不和合性獲得機構として提示した進化モデルの検証を行う。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

[1] Takada, Y., Murase, K., Shimosato-Asano, H., Sato, T., Nakanishi, H., Suwabe, K., Shimizu, K.K., Lim, Y.P., Takayama, S., Suzuki, G., Watanabe, M. Duplicated pollen-pistil recognition loci control intraspecific unilateral incompatibility in *Brassica rapa*. *Nat. Plants* 3, 17096, 2017.

[2] Murase, K., Shigenobu, S., Fujii, S., Ueda, K., Murata, T., Sakamoto, A., Wada, Y., Yamaguchi, K., Osakabe, Y., Osakabe, K., Kanno, A., Ozaki, Y., Takayama, S. MYB transcription factor gene involved in sex determination in *Asparagus officinalis*. *Genes Cells* 22, 115-123, 2017.

[3] Yasuda, S., Wada, Y., Kakizaki, T., Tarutani, Y., Miura-Uno, E., Murase, K., Fujii, S., Hioki, T., Shimoda, T., Takada, Y., Shiba, H., Takasaki-Yasuda, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Takayama, S. A complex dominance hierarchy is controlled by polymorphism of small RNAs and their targets. *Nat. Plants* 3, 16206, 2016.

[4] Kubo, K., Tsukahara, M., Fujii, S., Murase, K., Wada, Y., Entani, T., Iwano, M., Takayama, S. Cullin1-P is an essential component of non-self recognition system in self-incompatibility in *Petunia*. *Plant Cell Physiol.* 57, 2403-2416, 2016.

[5] Fujii, S., Kubo, K., Takayama, S. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nat. Plants* 2, 16130, 2016.

## 7. ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seiyu/>