

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05824

研究課題名(和文) アブラナ科植物の自家不和合性における受容体活性化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of receptor activation in Brassica self-incompatibility

研究代表者

村瀬 浩司 (Murase, Kohji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：50467693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物の自家不和合性は受容体キナーゼSRKとリガンドSP11のハプロタイプ特異的な相互作用によって起こる。本研究ではこの自家不和合性シグナルがどのように細胞内に伝達されるかを解明するために、SRKの細胞内キナーゼドメインの結晶化を試みた。SRKキナーゼドメインは大腸菌で発現させて、高発現かつ安定に発現できるSRKキナーゼドメインの領域を決定した。SRKキナーゼドメインのリコンビナントタンパク質を大量発現・精製を行い、結晶化スクリーニングにより結晶化条件を決定した。Spring-8にて結晶の反射データを収集したところ、最大4.3オングストロームの分解能をもつデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科植物の自家不和合性は雑種強勢を利用したF1ハイブリッド種子の生産に利用されており、自家不和合性を人為的に操作できる技術の開発が望まれている。SRKキナーゼドメインを阻害する薬剤はいくつか報告されているが、SRKに特異的な阻害剤を開発するためにはSRKキナーゼドメインの構造情報が重要である。本研究ではSRKキナーゼドメインの結晶化に成功し、構造決定に向けて一歩前進した。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility responses in Brassica are triggered by the haplotype specific interaction of pistil receptor kinase SRK and pollen ligand SP11. In this study, we tried crystallization of SRK kinase domain for uncovering the mechanism of SRK signal transduction. We determined SRK region which could be highly and stably expressed in bacteria cells. The SRK kinase proteins were expressed in large scale, purified three step chromatography, and crystal screened. Diffraction data were collected in SPring-8 and best data showed 4.3 angstrom resolution.

研究分野：植物科学

キーワード：自家不和合性

1. 研究開始当初の背景

被子植物の多くは 1 つの花に雄蕊および雌蕊をもつ両性花であり、自己の花粉で受精しやすい性質をもつ。そのため、被子植物の多くは種の遺伝的多様性を確保するために、自己の花粉を拒絶して非自己の花粉を受け入れる自家不和合性と呼ばれる機構をもつ。アブラナ科植物の自家不和合性は *S* と呼ばれる一遺伝子座の多数のハプロタイプによりコントロールされており、雌蕊と花粉がもつハプロタイプの型が一致すると、その花粉は拒絶される。*S* 遺伝子座には雌蕊および花粉でそれぞれ自他識別を行うための因子がコードされており、これまでに雌蕊側因子として受容体キナーゼをコードする SRK が、花粉側因子としてそのリガンドである SP11 が同定されている (Suzuki et al., *Genetics* 153, 391, 1999; Takayama et al., *PNAS* 97, 1920, 2000; Takasaki et al., *Nature* 403, 913, 2000)。雌蕊の先端にあるパピラ細胞に花粉が付着すると、花粉の表層にある SP11 が放出され、雌蕊の SRK はハプロタイプ特異的に SP11 と結合して、細胞内キナーゼドメインをリン酸化することが明らかになっている (Takayama et al., *Nature* 413, 534, 2001)。また、膜アンカー型タンパク質キナーゼ MLPK が SRK の下流で機能すること、SRK と相互作用すること、SRK によってリン酸化されることが明らかになっている (Murase et al., *Science* 303, 1516, 2004; Kakita et al., *Plant Cell* 19, 3961, 2007)。このようにアブラナ科植物の自家不和合性における自他識別は受容体キナーゼによるリガンドの特異的認識とリン酸化リレーによる情報伝達により行われていることが分子レベルで判明しつつあるが、SRK 活性化における構造レベルのメカニズムはほとんど不明であった。また、アブラナ科植物の自家不和合性は多くの根菜類において雑種強勢を利用した F₁ ハイブリッド種子の生産に利用されており、自家不和合性の人為的な制御技術の開発が望まれている。これまでにいくつかの SRK キナーゼドメインを標的とする阻害剤が報告されているが、より高活性で特異性の高い阻害剤を開発するためには SRK キナーゼドメインの構造情報が必要である。

2. 研究の目的

SRK は通常、雌蕊の細胞膜上で不活性型として存在しており、リガンドと結合すると 2 量体化したのち、SRK キナーゼドメインが自己リン酸化されて活性型となる。SRK キナーゼドメインのリン酸化された活性型とリン酸化されていない不活性型について立体構造を決定すれば、SRK 活性化メカニズムの一端が明らかにできると期待される。そこで、本研究では SRK 活性化メカニズムを解明するために、SRK キナーゼドメインの活性化型、不活性型の構造決定に向けた実験を行う。また、阻害剤を用いた共結晶化も行い、SRK に結合している阻害剤の立体配置を明らかにすることによって阻害剤改良に向けた構造情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

SRK キナーゼドメインの構造決定は X 線結晶構造解析のアプローチで行う。X 線結晶構造解析では大量の発現タンパク質が必要であり、SRK はリコンビナントタンパク質が凝集してしまうことがネックであったが、これまでのタンパク質エンジニアリングにより、SRK の活性を保持したまま大腸菌で大量に発現させることに成功している。そこで、本研究では結晶化に最適なコンストラクトの作製、大腸菌による SRK タンパク質の大量発現、精製、結晶化スクリーニング、反射データの収集を繰り返して構造決定可能なデータを得る。

4. 研究成果

SRK キナーゼドメインの最適なコンストラクトを作製するために、N 末端および C 末端両端からそれぞれデレーションシリーズを設計して、その領域を pET49b ベクターにサブクローニングした (図 1)。各ベクターはタンパク質発現用の大腸菌 Rosetta II にトランスフォーメーションしたのち、それぞれ 2 L ずつ LB 培地で培養して、OD600 が 0.8~1.0 になったところで IPTG を 100 μ M になるように加えて、16 で 24 時間タンパク質を発現させた。回収した大腸菌は超音波破碎機を用いて破碎し、100,000 g で 30 分遠心したのち、上澄みをグルタチオンセファロースカラムに供した。カラムを洗浄後、20 mM の還元型グルタチオン溶液でタンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質はゲルろ過クロマトグラフィーに供して凝集したタンパク質を除き、フォールディングした GST-SRK タンパク質を定量した。その結果、SRK キナーゼ

ドメインの N 末端側は 506 番目まで、C 末端側は 823 番目までデレーションさせても安定なタンパク質を得ることができたが、それよりも内側までデレーションさせるとタンパク質の終了が大きく減少した(図 1)。これらの結果から最適なコンストラクトは 506–

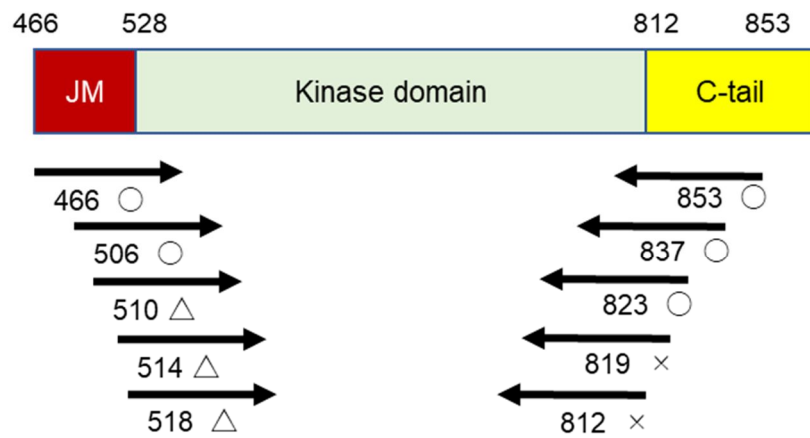


図1 SRKキナーゼドメインの最適化

823 であると結論し、該当領域を同様に pET49b にサブクローニングした。SRK キナーゼドメインは大腸菌内でリン酸化されているためこれを活性型とし、アクチベーションループ内の T682 および T686 をアラニンに変異させてリン酸化が起こらなくなった SRK を不活性型とした。

次に活性型、不活性型の SRK キナーゼドメインを大量発現させた。各 12 L の培養液を用いて同様の条件で発現させたのち、グルタチオンセファロースカラムによるアフィニティークロマトグラフィー、HRV3C プロテアーゼによる GST の切断、イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。回収率はそれぞれ 1~2 mg/L 程度であった。タンパク質溶液は 5 mg/mL に調整して JCSG キットを用いた結晶化スクリーニングを行った。384 条件に付いてスクリーニングを行ったところ、活性型 SRK では結晶が得られなかったが、不活性型 SRK では複数の条件で結晶が得られた(図 2)結晶化条件の最適化を行い、11% PEG3350, 50 mM AmSO₄ の条件で結晶が最も大きくなった。

これらの結晶について SPring-8 で反射データを収集したところ、最大で 4.3 オングストローム程度の分解能をもつデータを得ることができた。不活性型 SRK は結晶がクラスター化するため、アディティブスクリーンを用いた 96 分子種のスクリーニングを行ったが、反射データの改善はできなかった。活性型 SRK は

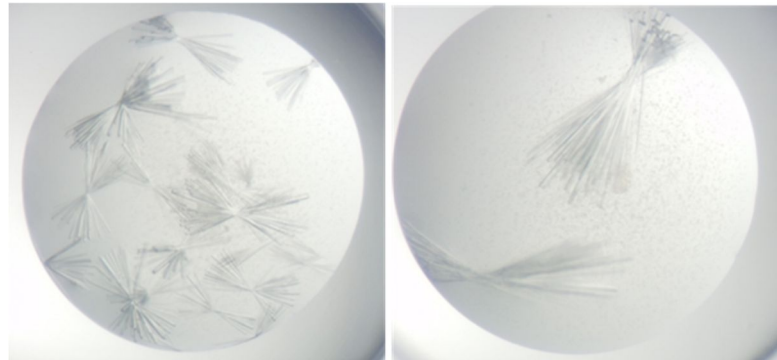


図2 SRKキナーゼドメインの結晶

結晶が出なかったため、ATP のアナログである AMP-PNP を加えて再度結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかった。本研究では結晶構造の決定までには至らなかったが、最適なコンストラクトの選抜と結晶化条件をある程度最適化でき、SRK キナーゼドメインの構造決定に向けて大きく前進することができた。

引用文献

1. Suzuki, G. *et al.* Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S9* haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* **153**, 391–400 (1999).
2. Takayama, S. *et al.* The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1920–1925 (2000).
3. Takasaki, T. *et al.* The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* **403**, 913–916 (2000).
4. Takayama, S. *et al.* Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-

- incompatibility. *Nature* **413**, 534–538 (2001).
5. Murase, K. *et al.* A Membrane-Anchored Protein Kinase Involved in *Brassica* Self-Incompatibility Signaling. *Science* (80-.). **303**, 1516–1519 (2004).
 6. Kakita, M. *et al.* Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell* **19**, 3961–3973 (2007).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 村瀬浩司、高山誠司	4. 巻 61
2. 論文標題 アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の構造生物学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 321-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.61.321	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murase Kohji, Moriwaki Yoshitaka, Mori Tomoyuki, Liu Xiao, Masaka Chiho, Takada Yoshinobu, Maesaki Ryoko, Mishima Masaki, Fujii Sota, Hirano Yoshinori, Kawabe Zen, Nagata Koji, Terada Tohru, Suzuki Go, Watanabe Masao, Shimizu Kentaro, Hakoshima Toshio, Takayama Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of self/nonself-discrimination in Brassica self-incompatibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18698-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------