

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06031

研究課題名(和文) サクラ属自家不和合性における新規の花粉側共通因子候補DNaJ-likeの機能解明

研究課題名(英文) Characterization of DNaJ-like protein, a novel non-S factor candidate of Prunus self-incompatibility

研究代表者

松本 大生 (Matsumoto, Daiki)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：30632129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バラ科サクラ属果樹はS-RNase型の自家不和合性を示すために、結実が不安定になりやすい。自家不和合性の発現には特異性決定因子だけでなく、その他の因子(共通因子)も必要であることが知られている。報告者は以前、S-RNaseと結合する花粉タンパク質のスクリーニングにおいて新規のDNaJ様タンパク質(SDJ)を単離した。本研究では、SDJが共通因子である可能性を検証するために一連の分子生物学的な解析を行った。調査の結果、SDJはバラ科の分化過程で出現した遺伝子であり、自家不和合性に関与するように特異的に進化した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S-RNase型の自家不和合性は双子葉植物の祖先的機構だと考えられているが、近年ではそれぞれの植物種でメカニズムが多様化した可能性も指摘されている。本研究では、S-RNase型自家不和合性が特に特異な進化を遂げたと考えているバラ科サクラ属果樹を研究対象にして、新規の花粉発現DnaJ様タンパク質SDJについて解析を行った。調査の結果、SDJ遺伝子はバラ科の出現以降に誕生し、サクラ属の自家不和合性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prunus fruit species exhibit S-RNase based self-incompatibility (SI), which results in instable fruit set. The other factors than pollen and pistil S determinants, Non-S factors, are also required for SI expression. We previously isolated a novel DNaJ-like protein in a screen for S-RNase binding pollen proteins. In this study, SDJ was analyzed at molecular level to clarify whether SDJ acts as a Non-S factor. Our study suggested that SDJ emerged during species differentiation in Rosaceae and evolved to gain a function in self-incompatibility.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：サクラ属 自家不和合性 S-RNase DnaJ

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性 (SI) とは、花粉・雌ずい間での自己/非自己認識を介した自殖回機構である。これまでの研究によって、バラ科果樹は S-RNase 型の SI を示すことが明らかにされている。S-RNase 型 SI とは、自己の花粉に対して細胞毒として働く S-RNase タンパク質を雌ずい側因子とする SI 機構である。S-RNase 型 SI はナス科やオオバコ科、アカネ科、ミカン科にもみられることから、双子葉植物の祖先的機構と考えられている。しかしながら様々な植物種での知見が集積するにつれ、S-RNase 型自家不和合性のメカニズムは種によって異なる進化を遂げてきたことが徐々に認識されるようになった。そのなかで特に注目を集めたのが、サクラ属果樹の事例であった。

2000 年代初頭より、サクラ属は他の植物種とは異なる「自己認識型」の S-RNase 型 SI を有することが知られていた。これは花粉側因子の作用の違いによるものであろうと推察されており、花粉側因子の進化解析を行ったいくつかの研究がこのことを支持してきた。一方で、花粉側因子の作用以外の面では、サクラ属 SI の分子機構の特殊性は認識されていなかった。興味深い報告がなされたのは、本研究の開始直前にあたる 2018 年のことである。花粉の特異性決定因子および雌ずいの特異性決定因子を除く、SI の発現に必要な因子は共通因子と呼ばれるのだが、サクラ属においてはじめての共通因子が同定された。この遺伝子は花粉特異的な発現を示す GST 様タンパク質 (MGST) であり、興味深いことに、サクラ属・オランダイチゴ属の共通祖先において重複した遺伝子から特異的に進化したものであった。すなわち、サクラ属 SI では花粉側因子のみではなく背景となる分子機構自体もまた独自の進化を遂げた可能性が示されたのである。

サクラ属 SI 分子機構を理解して、その特異性を明確にするためには、さらに多くの共通因子を同定する必要がある。そのような状況の中、報告者らはカイコ・バキュロウイルス発現系を利用して、世界で初めてサクラ属の組換え S-RNase 発現に成功した。この組換え S-RNase を利用した共免疫沈降および nano LC MS/MS を行ったところ、S-RNase と結合するオウトウの花粉タンパク質として MGST とともに新規の DnaJ 様タンパク質 (S-RNase binding DnaJ-like, SDJ) を単離することに成功した (Matsumoto・Tao, 2019 Plant Mol. Biol.)。ドメイン予測と相同性検索から、SDJ は多様な機能を担う type III-DnaJ に属することが判明したが、他植物種においても SDJ 相同遺伝子研究報告はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サクラ属の S-RNase 結合花粉タンパク質候補として単離した SDJ の分子生物学的な特徴づけと機能調査を行うことで、SDJ が共通因子として働く可能性があるか検証することである。

3. 研究の方法

本研究ではオウトウ (*Prunus avium*) を植物材料として一連の実験を行った。

(1) オウトウ SDJ (PavSDJ) の分子生物学的な特徴づけ

PavSDJ に関する系統解析、発現解析、および細胞内局在調査を行った。

系統解析では、まず Phytozome ver.12.0 より主要な被子植物種における SDJ 様タンパク質のホモログを blast P 検索によって収集した (e-value: e-25)。MUSCLE を用いてアミノ酸配列をアライメントし、ML 法による系統樹を作成した。

発現解析では、オウトウ‘佐藤錦’の葉および各花器官から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。qRT-PCR によって、PavSDJ およびその姉妹遺伝子の発現量を相対定量した。

PavSDJ の細胞内局在調査では、GFP 融合 PavSDJ をアグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコの葉に一過的に発現させ、表皮細胞内の蛍光局在を観察した。

(2) PavSDJ と他タンパク質の相互作用に関する調査

異なるアレルの S-RNase と PavSDJ の相互作用調査では、カイコで発現させた DDDDK タグ融合 PavS3-,S4-,S6-RNase および抗 DDDDK タグ抗体ビーズを用いて、オウトウ‘佐藤錦’の発芽花粉粗抽出物に対する共免疫沈降を行った。

PavSDJ の姉妹遺伝子産物の S-RNase 結合能の調査においては、アグロインフィルトレーション法によってベンサミアナタバコ葉内で Myc タグ融合 PavSDJ-sister を一過的に発現させた。このベンサミアナタバコ葉の抽出物に対して、組換え DDDDK タグ融合 PavS6-RNase および抗 DDDDK タグ抗体を用いた共免疫沈降を行った。

PavSDJ の花粉内での相互作用パートナーの探索では、まず、PavSDJ ペプチドに対するウサギ抗血清を作製し、アフィニティ精製を行うことで抗 PavSDJ 抗体を調整した。オウトウ‘佐藤錦’

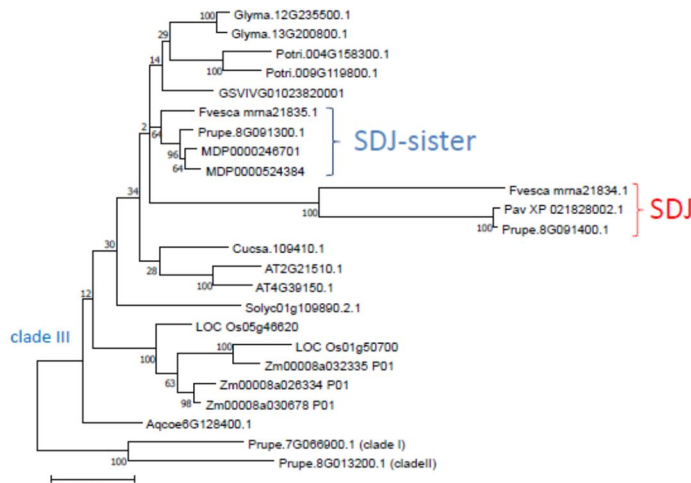
の発芽花粉粗抽出物に対して、抗 PavSDJ 抗体を用いた共免疫沈降を行い、nano LC-MS/MS による共免疫沈降物の網羅同定を行った。

PavSDJ と S-RNase の結合における PavSLFL6 の介在の調査においては、上記と同様にアグロインフィルトレーション法によって Myc タグ融合 PavSDJ、HA タグ融合 PavSLFL6 および PavSSK1 を一過的に発現させた。これらのベンサミアナタバコ葉の抽出物に対して、組換え DDDDK タグ融合 PavS6-RNase および抗 DDDDK タグ抗体を用いた共免疫沈降を行った。

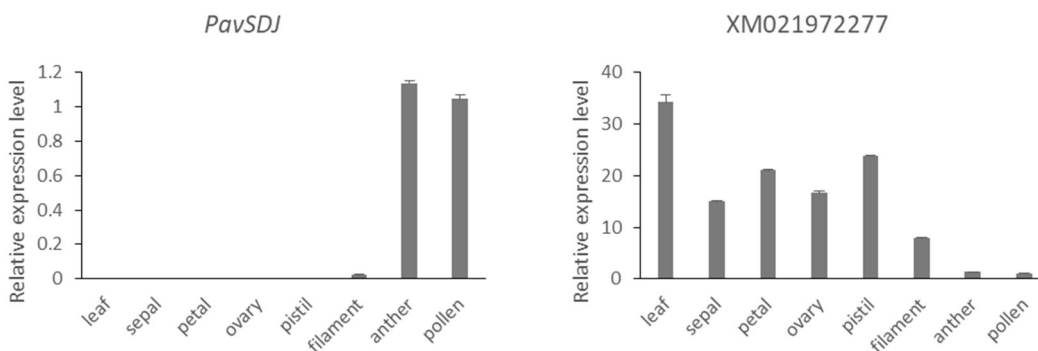
4. 研究成果

(1) オウトウ SDJ(PavSDJ)の分子生物学的な特徴づけ

系統解析を行ったところ、被子植物種の SDJ ホモログは3つのクレードに分類された。SDJ を含むクレード III のホモログは、調査したほとんどの被子植物において種特異的な単一のクラスターを形成していた。一方、SDJ はサクラ属とオランダイチョゴ属にのみ存在しており、それとは別にバラ科に共通したホモログ (SDJ 姉妹遺伝子) が存在していた (第1図)。興味深いことに、この進化パターンはサクラ属 SI の共通因子である MGST に類似していた。発現解析を行ったところ、SDJ は葯と花粉で強く発現していたのに対して、SDJ 姉妹遺伝子は葉およびすべての花器官で発現していたものの、葯と花粉での発現量は低かった (第2図)。ベンサミアナタバコ葉において GFP 融合 PavSDJ を一過的に発現させたところ、細胞質基質に局在することが明らかになった。このことから PavSDJ は、S-RNase が花粉細胞の細胞質に侵入した後何らかの機能を果たしていると推察された。



第1図 単子葉・双子葉植物のSDJ様タンパク質のML tree



第2図 オウトウ‘佐藤錦’におけるSDJおよび姉妹遺伝子(XM021972277)の器官別発現 (n=3) 発現量はユビキチン様遺伝子で補正

(2) PavSDJ と他タンパク質の相互作用に関する調査

‘佐藤錦’花粉粗抽出物に対する組換え S-RNase による免疫沈降を行ったところ、オウトウの S1, S3, S6 ハプロタイプの S-RNase 産物はいずれも PavSDJ と結合することが確認された。さらに、ベンサミアナタバコ葉で発現させた Myc-PavSDJ もまた組換え S-RNase 結合能を有していた一方で、同様に発現させた Myc-PavSDJ 姉妹遺伝子産物は組換え S-RNase とは結合しなかったことから、PavSDJ は S-RNase との結合能を獲得するよう進化したことが示唆された。花粉粗抽出物に対する抗 PavSDJ 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、PavSDJ を含む複数のタンパク質を回収することができた。主要な共免疫沈降物は、PavSDJ、S-locus F-box protein-like 6 (PavSLFL6)、PavSLFL6 と結合することが報告されている Skp1 様タンパク質および

60S リボソームタンパク質であった。PavSDJ - PavSLFL6 - PavS-RNase の三者間相互作用 SLFL タンパク質群には S-RNase と直接結合するものが複数報告されていることから、PavSDJ が PavSLFL6 を介して S-RNase と結合する可能性について検証した。Myc タグ融合 PavSDJ または HA タグ融合 PavSLFL6 を発現させたベンサミアーナタバコ葉抽出物に対して組換え S-RNase による共免疫沈降を行ったところ、PavSLFL6 は PavSDJ 依存的に回収された。このことから PavSDJ は S-RNase と直接結合すること、また PavSLFL6 は PavSDJ を介して間接的に S-RNase と結合することが確認された。

以上の結果から、SDJ はバラ科祖先種において S-RNase と結合するよう特異な進化を遂げた DNaJ であり、共通因子として機能する可能性が高いものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本大生、田尾龍太郎
2. 発表標題 S-RNase結合DNA様タンパク質の機能評価
3. 学会等名 園芸学会 令和6年度春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松本大生・増井果歩・金岡雅浩・田尾龍太郎
2. 発表標題 S-RNaseと結合する花粉発現DNA様タンパク質の特性評価
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本大生・山崎稜平・平 智
2. 発表標題 オウトウ‘佐藤錦’花粉管の自己雌ずい内における伸長パターンの評価
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------