

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K06110

研究課題名（和文）タンパク質構造に基づいたアブラナ科植物の自家不和合性を制御する分子の創出

研究課題名（英文）Creation of molecules regulating the self-incompatibility in Brassicaceae plants based on the protein structures.

研究代表者

森脇 由隆（MORIWAKI, Yoshitaka）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：70751303

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）：本研究ではアブラナ科の自家不和合性を制御するタンパク質、SRKとSP11の配列相同性と構造についてのMultiple sequence alignment（MSA）と、2021年登場されたAlphaFold2とColabFoldを組み合わせることで、非常に困難とされたこれらのタンパク質の高信頼度な構造モデリングを可能にすることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SRK、SP11タンパク質構造およびそれらの複合体の高精度な予測が可能になったことで、アブラナ科の自家不和合性機構が構造的に可視化され、分子論的な理解が大きく進むことが期待される。また、この研究成果を元に将来的に人工的なSP11分子の創出を行うことでアブラナ科植物の受粉機構を人為的に制御することが可能になれば、我々人類の食卓に上る、キャベツ、ブロッコリー、小松菜などの主要なアブラナ科の野菜を生産する育種現場において、遺伝的に望ましい形質を持つ品種を選択的に保存または改変することができるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that the tertiary structure of SRK and SP11, the key proteins that regulate self-incompatibility in Brassicaceae, could be modeled with very high confidence using AlphaFold2 (ColabFold) and their multiple sequence alignment (MSA). Modeling of their structures and complexes has been considered challenging in the field of protein structure prediction because of their exceptional number of disulphide bonds and sequence diversity. These results are expected not only to simplify non-experimental prediction of naturally occurring SRK-SP11 protein complexes, but also to enable their artificial creation.

研究分野：生物物理学

キーワード：農芸化学 タンパク質科学 タンパク質構造予測 自家不和合性

1. 研究開始当初の背景

植物の自家不和合性とは遺伝的多様性を維持するために、自己の花粉を拒否し他の株からの花粉を獲得する機構のことである。アブラナ科植物は特にその研究と説明が進められている種の1つである。2000年に雌蕊に存在する受容体タンパク質 *S*-receptor kinase (SRK) と雄蕊の葯から放出される花粉に存在するその低分子リガンド *S*-locus protein 11 (SP11) が自家不和合性を分子的に制御するタンパク質分子であることが相次いで同定された。植物の自家不和合性は基本的に *S* 遺伝子座上に存在する複数

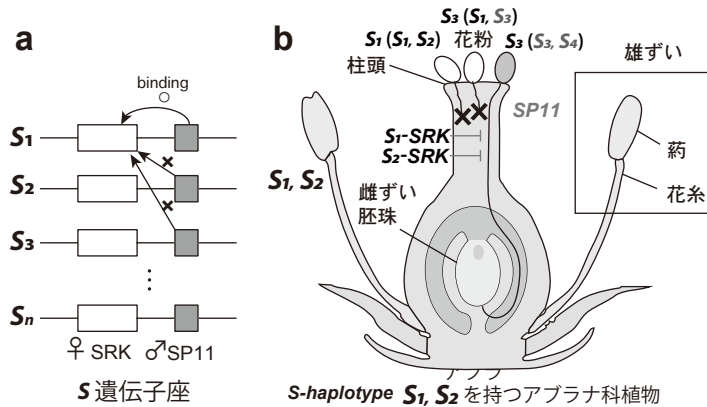


Fig. 1 *S* 遺伝子座にハプロタイプ S_1, S_2 を持つアブラナ科植物の模式図。(a) 同ハプロタイプ由来の SRK と SP11 の組のみが強く結合する。(b) 雌蕊中の SRK と花粉中の SP11 のハプロタイプが一致するとその花粉は拒絶される。

数のハプロタイプ (遺伝的に連鎖している多型; S_1, S_2, \dots, S_n) によって制御され、雌蕊と雄蕊に由来する花粉の表現型が持つ *S* 遺伝子型が一致し、SRK と SP11 が複合体を形成したとき、シグナルが放出されてその花粉は拒絶される (Fig. 1)。それゆえ、ある株において自身の雄蕊から放出される花粉が雌蕊の柱頭に付着しても受精しない。これまでの長年のフィールドワークによる研究から、SRK, SP11 のハプロタイプは合計 150 種類以上の存在が示されている。一方、森脇と研究分担者の村瀬博士らの 2020 年までの研究においてハプロタイプ *S8* の SRK, SP11 の複合体構造の結晶構造が 1 つ報告されたものの、両分子の実験室系での不安定性と SP11 の配列・構造多様性のために、その詳細な分子機構を包括的に理解することは実験的にも当時の計算科学的にも困難とされていた。

2. 研究の目的

本研究はアブラナ科植物の自家不和合性を制御する分子の創出を目的とする。その前段階としてまず SRK, SP11 の複合体形成機構を全ハプロタイプ網羅的に解き明かし、それに則った合理的な分子創出を目指した。

3. 研究の方法

本研究を開始した当時は分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) シミュレーションとフラグメントアセンブリ法を組み合わせた構造サンプリング法を用いて配列/構造多様性の大きい SP11 分子のモデリングを行うことを計画していた。しかし 2021 年 7 月に利用可能となったタンパク質の構造予測ソフトウェア AlphaFold2 は非常に高精度な立体構造を提示するだけでなく、後に複

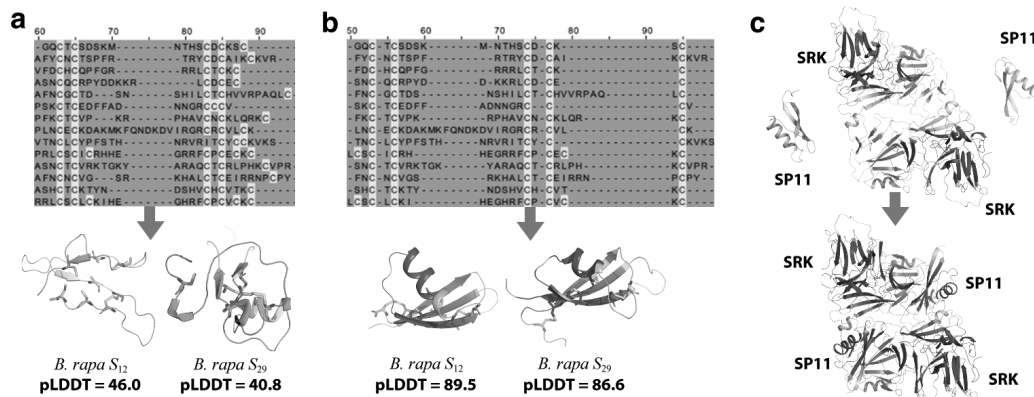


Fig. 2 AF2/ColabFold に与える MSA が構造予測に大きく影響する。(a-b) 通常の方法で取得した SP11 についての MSA (a) とシステイン残基の位置を合わせた MSA (b)。(b) を用いて構造予測したときの pLDDT は大きく向上した。(c) SRK と SP11 の改良 paired MSA を用いることで、複合体予測精度も大幅に向上した。

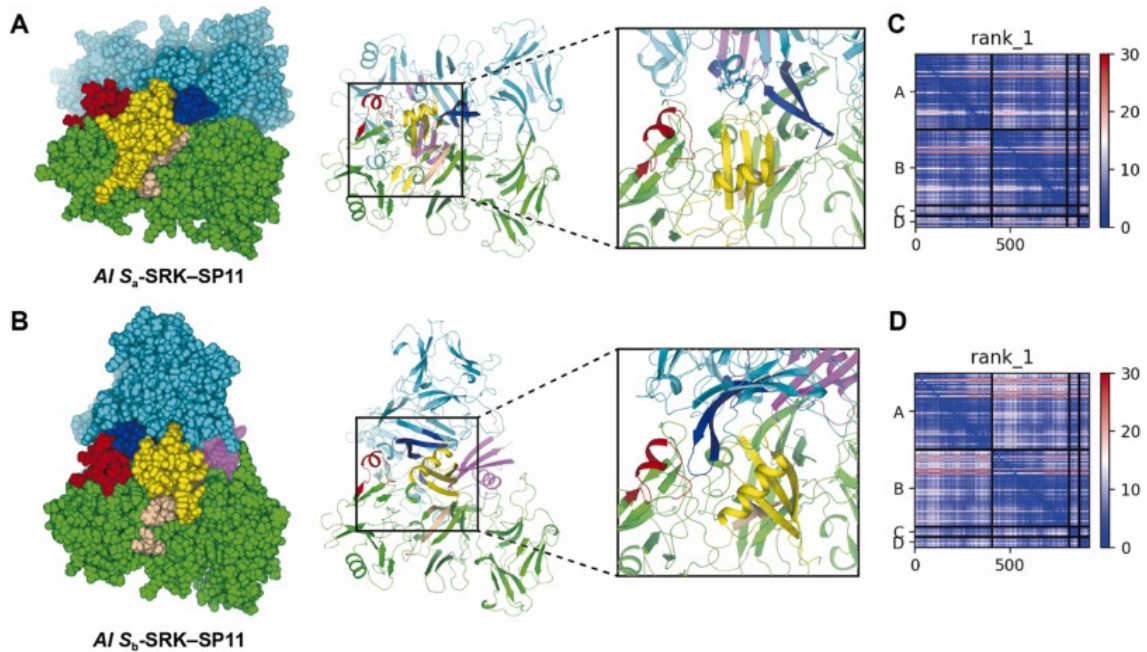


Fig. 3 AF2/ColabFold によって新規に予想された *Arabidopsis lyrata* (*Al*)の中に見られる新規 SRK-SP11 相互作用形式。(A)が *Al* S_a ハプロタイプなどで新規に発見された相互作用形式。(B)は結晶構造が報告されている *Brassica rapa* (*Br*) S₈, S₉ と同様の相互作用形式。

合体予測も可能であることが森脇によって示されたことで、その機能を搭載した AlphaFold version 2.1 または ColabFold による構造予測を用いて SRK, SP11 のモデリングを行うことに変更した。また、これらの予測精度がインプットとしてこれらのソフトウェアに与える Multiple sequence alignment (MSA) の質と量に依存することに着目し、これまでのフィールドワークによって配列決定されていた 98 の *S* ハプロタイプ由来の SRK, SP11 ペアアミノ酸配列のみを用いて MSA を構築することで劇的に予測精度が改善することを利用した。

4. 研究成果

AlphaFold2 [4]の高い構造予測精度は、この予測問題を解決できることを期待させるものであったが、予想に反していくつかのハプロタイプの SP11 の予測構造の信頼度 (AF2 が出す pLDDT スコア) は低く、複合体予測も悪い結果を示していた (Fig. 2c 上)。しかし、ここで森脇は AF2 の予測精度が予測対象のアミノ酸配列についての類縁配列の量と質に大きく依存していることに着目し、SP11 について適切な MSA が形成されていないことが予測失敗の原因であることを突き止め、この問題を解決した自作の MSA を用意して構造予測を再度行うことで、SP11 および SRK-SP11 の複合体予測精度が大きく改善したことを示した (Fig. 2a-c)。結果として、SRK-SP11 ペアの配列が判明しているアブラナ科の 98 の *S* ハプロタイプのうち 80 について信頼性の高い SRK-SP11 複合体予測構造を提示することができるようになり、2020 年時よりもさらに大きく包括的に SRK-SP11 の相互作用形式を理解することができるようになった。特に、*Arabidopsis lyrata* (*Al*)の一部のハプロタイプで発見された新規な相互作用形式はこれまでの結晶構造解析が行われていた *Brassica rapa* S₈, S₉ のそれらと大きく異なるにもかかわらず、Predicted Aligned Error 上ではもっともらしい相互作用と予想されているため (Fig. 3)、今後これらについての結晶構造解析の結果との整合性が興味深いところである。この研究成果は 2023 年 10 月に Computational and Structural Biotechnology Journal 誌上で公開された。

これらの結果から、我々は各ハプロタイプ由来の SRK に対する SP11 の認識機構について重要な予測結果を得た。すなわち、配列進化的に近縁なハプロタイプ同士では主鎖構造はほぼ同じまま、わずかに界面に存在する残基を変化させていることで 1 対 1 結合を達成している一方で、各 SP11 分子の構造多様性のために、対応する SRK と結合する際の結合界面が大きく変化していることを見出された。しかし、SRK 側の主鎖構造は *S* ハプロタイプ全体を通じて大きな変化が見られないため、すべての SRK 分子に結合できるような主鎖構造を持つ人工的な SP11 様分子の作製は可能であるかのように考えられる。現在はその規準を満たすような SP11 の主鎖構造を Rosetta で作製し、側鎖を ProteinMPNN でデザインした分子の構造決定を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Sawa Tomoki, Moriwaki Yoshitaka, Jiang Hanting, Murase Kohji, Takayama Seiji, Shimizu Kentaro, Terada Tohru	4. 巻 21
2. 論文標題 Comprehensive computational analysis of the SRK-SP11 molecular interaction underlying self-incompatibility in Brassicaceae using improved structure prediction for cysteine-rich proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 5228 ~ 5239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2023.10.026	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔣 瀚霆, 清水 謙多郎, 寺田 透, 森脇 由隆, 村瀬 浩司, 高山 誠司
2. 発表標題 Accurate modeling and mechanistic investigation of the complexes of the SRK/SP11 proteins of Brassicaceae
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤 知希, 森脇 由隆, 寺田 透, 村瀬 浩司, 高山 誠司, 清水 謙多郎
2. 発表標題 Haplotype exhaustive prediction of SRK/SP11 complex structure in Brassicaceae using a modified MSA
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森脇 由隆, 澤 知希, 村瀬 浩司, 高山 誠司, 清水 謙多郎, 寺田 透
2. 発表標題 Haplotype-specific self-recognition mechanism in Brassicaceae elucidated by curated MSA and AlphaFold2
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	村瀬 浩司 (Murase Kohji) (50467693)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授 (12601)	

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
---------	---------