

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20581

研究課題名（和文）バラ科サクラ属の自家不和合性に特異的な花粉側因子MGSTの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of MGST, Prunus-specific pollen part self incompatibility factor

研究代表者

大野 健太郎（Ono, Kentaro）

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10910896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：バラ科サクラ属のS-RNase型自家不和合性のみに関わる因子MGSTの機能解析を行った。MGSTとS-RNaseのタンパク質間相互作用解析の結果、両者が特定の条件のみにおいて結合する可能性を示した。MGSTのタンパク質予測立体構造は、標的分子のジスルフィド結合に対して酸化還元的に機能するタンパク質との構造類似性が確認された。一方で、測定した条件においてはMGSTにグルタチオン抱合活性、ジスルフィド結合還元活性、S-RNaseの活性制御能は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家不和合性を示す植物は自家受粉により果実や種子が得られないため、果実生産現場や育種現場、遺伝解析研究においては自家不和合性を自由に人為的に制御できることが理想である。人為制御のためにはメカニズムの解明が必要であるが、バラ科サクラ属植物の自家不和合性は他種と異なる独自のメカニズムを有し、そのメカニズム解明は学術的にも興味を引くものである。本研究では、サクラ属に特異的な自家不和合性因子MGSTの機能解析を行い、サクラ属に特異的なメカニズムの解明に役立つ情報を得た。

研究成果の概要（英文）：Molecular function of MGST was analyzed in this study. MGST is the protein which functions in the self-incompatibility reaction of Prunus, but not in the other species. The protein-protein interaction analysis of MGST and S-RNase showed that these two proteins interact in a limited condition. Predicted conformation of MGST was similar to that of the proteins which catalyze the oxidoreduction of the disulfide bond of their target molecules. On the other hand, MGST did not exhibit glutathione conjugation activity, disulfide reduction activity, or the ability to regulate the activity of S-RNase.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：バラ科サクラ属果樹 自家不和合性 タンパク質機能解析 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性を示す植物種は自家受粉しても結実しないため、自然界では種内の遺伝的多様性の維持に役立つ。一方で、食糧生産の観点からは他家受粉の確保に労力やコストがかかり、遺伝解析研究においても自殖をできないことは研究の障壁となっている。一部の園芸作物種においては人為的な自家「和合化」技術が確立した例もあるが、本研究で扱うバラ科サクラ属では成功例がないため、自家不和合反応の機構を解明して技術開発の手がかりとする必要がある。

バラ科やナス科などは S-RNase 型の自家不和合性を示す。他家受粉した花粉は受精することができるが、自家受粉した花粉は花柱内部を伸長している花粉管が胚珠に到達する前に伸長を停止して、受精に至らない。花粉と雌ずいの中の自己 / 非自己の判定機能は、S 因子が担う。S 因子は、雌ずいで発現する S-RNase (S-ribonuclease) と花粉で発現する F-box タンパク質のことであり、S 遺伝子座に連鎖している。S-RNase 型の自家不和合性はバラ科やナス科などでみられるが、バラ科共通祖先からサクラ属が派生した進化の過程で、サクラ属のみ他種と異なる反応機構を獲得したとされる (Tao・Iezzoni Sci. Hort. 2010)。その根拠は、サクラ属の S 因子変異体の表現型が、他のバラ科やナス科植物種における変異体の表現型と異なる点 (Ushijima et al. Plant J. 2004) など、状況証拠に基づいている。しかし、サクラ属の反応機構の詳細は未解明であり、「サクラ属に特異的な自家不和合反応において、どういった分子がどのように反応することで、自己の花粉管のみが伸長停止するか」についてはほとんど分かっていない。

S-RNase 型自家不和合性においては、S-RNase と F-box タンパク質が機能することはこれまでに解析された種において共通である。近年、サクラ属の自家和合化変異体を使用した解析により、S 因子以外の自家不和合性因子として、花粉で発現する GST (glutathione S-transferase) 様遺伝子の *MGST* (*M-locus encoded GST*) が同定された (Ono et al. Plant Cell Physiol. 2018)。*MGST* は、サクラ属に特異的に存在する遺伝子であるため、サクラ属特異的な自家不和合反応機構の解明の重要な手がかりとして注目されている。

2. 研究の目的

サクラ属特異的な自家不和合反応機構の解明の糸口として、本研究では *MGST* の分子機能の解明を目的とした。特に、既知の自家不和合反応因子とのタンパク質-タンパク質間相互作用の解析および *MGST* の酵素活性の解析により、「*MGST* が「どのように」機能するか」の解明を試みた。また、*in silico* においてタンパク質の三次元構造の予測精度が近年急速に向上している点に着目し、*MGST* の立体構造と機能を予測した。さらに、自家受粉した花粉の花粉管が花柱内部を伸長している間の「いつどのタイミングで」*MGST* が機能するかを明らかにするために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて *MGST* を一過的に発現抑制した花粉の花粉管伸長観察試験を行った。

3. 研究の方法

MGST のタンパク質間相互作用解析

サクラ属のウメ (*Prunus mume*) の組換え *MGST* と花柱から抽出した S-RNase を共存条件でインキュベートした後に、組換え *MGST* に融合した strep(II) タグでプルダウンを行い、ウエスタンブロットにより S-RNase と *MGST* の相互作用を解析した。また、サクラ属のオウトウ (*P. avium*) の組換え S-RNase と花粉から抽出した *MGST* を共存条件でインキュベートした後に、組換え S-RNase に融合した DDDDK タグで共免疫沈降を行い、ウエスタンブロットにより S-RNase と *MGST* の相互作用を解析した。

MGST の酵素活性解析

MGST の推定アミノ酸配列から予測される酵素活性を、組換えタンパク質を作出して測定した。即ち、ウメの組換え *MGST* を作出し、グルタチオン抱合活性のモデル基質の 2,4-Dinitrochlorobenzene (CDNB) 溶液中でインキュベート後に吸光度を測定して、CDNB に対してのグルタチオン抱合活性を測定した。また、組換え *MGST* をヒト組換えインスリンとインキュベート後に吸光度を測定して、インスリンに対してのジスルフィド結合の還元活性を測定した。また、組換え *MGST* をウメの花柱から抽出した S-RNase と共存条件でインキュベートした後に、RNA を加えて再度インキュベートして RNA 濃度を測定することで、*MGST* の S-RNase に対しての活性制御能を測定した。

MGST の機能するタイミングの解析

MGST の一過的発現抑制を行うために、Ono et al (HortJ. 2022) で使用したアンチセンスオリゴを花粉に処理してから自家受粉を行った。自家受粉とインキュベート後に花柱を固定して、蛍光顕微鏡を用いて花粉管の伸長距離を測定することで、*MGST* 発現抑制による花粉管伸長距離

の増大を評価した。MGST 発現抑制による花粉管伸長距離の増大がみられるタイミングをまた、アンチセンスオリゴの処理による花粉へのダメージを抑えて MGST 発現抑制効果を高めるために、オリゴを花粉に処理する代わりに先に柱頭に乘せてから花粉を受粉する方法や、吸引機とフィルターを用いたオリゴ処理前花粉の精製を行った。

in silico 解析による MGST の機能予測

MGST のアミノ酸配列は、広義の GST 様の配列をしているが、他の生物種において十分にアミノ酸配列の類似した GST タンパク質の分子機能に関する情報が不足しており、配列情報から分子機能を特定することが困難であった。そこで、in silico でタンパク質の立体構造を予測する手法が近年急速に発展していることに着目し、タンパク質立体構造から MGST の機能の予測を試みた。ウメとオウトウの MGST のアミノ酸配列から、それぞれのタンパク質三次元構造を予測した。また、タンパク質構造データベースに対しての構造アライメントを行い、予測した構造と類似の三次元構造を示すタンパク質を探索した。

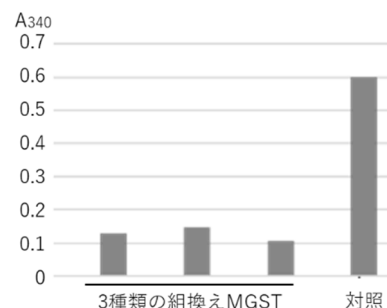
4. 研究成果

MGST のタンパク質間相互作用解析

MGST と S-RNase のタンパク質間相互作用解析を 2 つの条件で行ったところ、両者が結合することを示すデータと、結合しないことを示すデータが得られた。この結果より、両者の相互作用には花粉由来の他の物質の存在が必要である可能性を考察した。

MGST の酵素活性解析

組換え MGST は、モデル基質の CDNB に対してのグルタチオン抱合活性を示さなかった(第 1 図)。また、ヒトインスリンに対してのジスルフィド還元活性を示さなかった。さらに、MGST の存在の有無により、S-RNase による RNA 分解活性に有意差は検出されなかった。従って、測定を行った条件においてはこれらの活性を有していないことが示され、測定条件においては MGST が活性を発揮できないか、または MGST がこれら以外の分子機能を有する可能性が考えられた。



第 1 図 MGST の CDNB に対してのグルタチオン抱合活性

MGST の機能するタイミングの解析

MGST の発現抑制による花粉管伸長の促進効果は、花粉一粒ごとのバラつきが大きく、明瞭な差異を見出すことが難しかった。複数の処理方法を試して、オリゴヌクレオチド処理自体による花粉へのダメージが少なくなる処理方法を検討したが、いずれも処理自体による花粉へのダメージが大きく、明確な判断に至ることのできるデータは得られなかった。

in silico 解析による MGST の機能予測

予測した MGST のタンパク質立体構造と類似の構造をしたタンパク質をデータベースから検索したところ、ウメの MGST とオウトウの MGST で類似の結果が得られた。標的分子のジスルフィド結合に対して酸化還元的に機能するタンパク質が多く見つかり、MGST も同様の反応を制御する可能性が考えられた。

以上の結果により、MGST は花粉に由来する他の因子の存在条件において、S-RNase の分子内のジスルフィド結合に対して酸化還元的に機能する可能性を見出した。今後さらに条件を増やして検証実験を行う必要があるが、本研究で得たデータから MGST の具体的な分子機能の予測をたてることができた。

< 引用文献 >

- ・ Ono, K., T. Akagi, T. Morimoto, A. Wünsch, and R. Tao. 2018. Genome re-sequencing of diverse sweet cherry (*Prunus avium*) individuals reveals a modifier gene mutation conferring pollen-part self-compatibility. *Plant Cell Physiol.* 59 (6): 1265-1275. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy068>
- ・ Ono, K., K. Masui, and R. Tao. 2022. Artificial control of the *Prunus* self-incompatibility system using antisense oligonucleotides against pollen genes. *HortJ.* 91 (4): 437-447. <https://doi.org/10.2503/hortj.QH-002>
- ・ Tao, R. and A. F. Iezzoni. 2010. The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.* 124 (4): 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.025>

• Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni, and R. Tao. 2004. The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39 (4): 573-586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02154.x>

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 0件）

1. 著者名 Kentaro Ono, Daiki Matsumoto, and Ryurato Tao	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of the molecular function of MGST, the pollen-part modifier of the gametophytic self-incompatibility in Prunus species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulture	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2022.1342.35	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大野健太郎, 松本大生, 田尾龍太郎
2. 発表標題 サクラ属に特異的に存在する自家不和合性花粉側共通因子MGSTの分子機能解析
3. 学会等名 令和4年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Ono, Daiki Matsumoto, Kaho Masui, and Ryurato Tao
2. 発表標題 Characterization of the molecular function of MGST, the pollen-part modifier of the gametophytic self-incompatibility in Prunus species
3. 学会等名 1st international symposium on reproductive biology of fruit tree species (国際学会)
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
---------	---------