

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 21 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850019

研究課題名(和文)パラ科サクラ属における自家不和合性ジェネラルインヒビター候補の機能解析

研究課題名(英文)Biochemical study of the general inhibitor candidates in the gametophytic self-incompatibility in Prunus.

研究代表者

松本 大生 (MATSUMOTO, Daiki)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：30632129

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)：パラ科サクラ属自家不和合性におけるS-RNase無毒化因子(general inhibitor; GI)の同定を目的とし、GI候補とされるS-locus F-box genes with low allelic polymorphism 1、2、3 (SLFL1, SLFL2, SLFL3)の生化学的特性を調査した。本調査によりSLFLsはいずれもSCF複合体形成能を有していること、またSLFL1、2はS-RNaseと結合できることが明らかとなった。これらの結果はSLFLが有力なGI候補であることを支持するものであった。

研究成果の概要(英文)：To identify the hypothetical general inhibitor (GI) which is suggested to detoxify S-RNase cytotoxicity in self-incompatibility in Prunus, the biochemical characterization of the candidate proteins S-locus F-box genes with low allelic polymorphisms 1, 2, 3(SLFL1, SLFL2, SLFL3) was attempted. In this study, the SCF complex formation with SLFL and the S-RNase-binding capacity of SLFL1, 2 were confirmed. These results supported SLFLs as the strong GI candidates.

研究分野：果樹園芸

キーワード：サクラ属 自家不和合性 S-RNase SLFL 果樹

1. 研究開始当初の背景

バラ科サクラ属果樹の多くは、花粉・花柱間の自己非自己認識を介して近縁な個体間での受精が防がれる性質である自家不和合性を示す。本性質は種の遺伝的多様性の維持に貢献してきた一方、果樹栽培においては結実不安定をもたらす要因となっている。バラ科サクラ属果樹の自家不和合性は園芸上重要な生理現象であるため、その機構解明を目指した一連の分子生物学的研究がこの二十年間展開されてきた。

これまでに、バラ科サクラ属自家不和合性における花柱側特異性を担う因子として花粉に対する細胞毒タンパク質である S-RNase が、花粉側特異性を担う因子として F-box タンパク質である SFB が遺伝解析により同定されている (Ushijima et al., 1998, 2003)。F-box タンパク質とは、Skp1 タンパク質、Cul1 および Rbx1 とともに SCF 複合体を形成することで、標的タンパク質をポリユビキチン化し分解に導く分子種である。因子発見当初、自家不和合性における自己非自己識別の分子基盤は SFB による非自己 S-RNase の分解誘導を想定した単純な二因子間相互作用モデルが提唱されていた。しかしながらその後、SFB が欠失した変異体は和合化することが相次いで報告されたことを受け、現在ではサクラ属の花粉には自己・非自己問わず全ての S-RNase を無毒化する分子(GI)が存在すること、SFB は自己 S-RNase 毒性の保護に機能することが提唱されている (Yamane et al., 2003; Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2004; Tao and Iezzoni, 2010)。よってバラ科サクラ属自家不和合性分子メカニズムを解明するうえで GI 同定は重要な課題であるものの、その存在が指摘されてから永らくその実体は明らかとなっていない。

本研究の着手当初、GI を探索するうえで手がかりとなる知見がいくつか報告されていた。まず、同じく S-RNase を花柱側因子とする自家不和合性を示すナス科やバラ科ナシ亜科において、その花粉側因子としても F-box タンパク質が同定されていた。興味深いことに、これら植物種の花粉側因子はバラ科サクラ属のそれと異なり、非自己 S-RNase の分解誘導に機能することが示されていた (Sijiac et al., 2004; Qiao et al., 2004; Qiao et al., 2004; Hua and Kao, 2006; Huang et al., 2006; Zhao et al., 2010; Kubo et al., 2010; Kakui et al., 2011, Chen et al., 2012)。このことは、多くの植物種が、S-RNase の無毒化機構として F-box タンパク質によるポリユビキチン化を採用していることを示している。

次に、バラ科サクラ属の自家不和合性遺伝子座周辺にも機能未知の花粉側因子 F-box 遺伝子 (SLFL1、SLFL2、SLFL3) が存在することが知られていた (Ushijima et al., 2003, 2004; Entani et al., 2003)。その後 SLFLs はバラ

科ナシ亜科花粉側因子と系統的に近いこと、Skp1 様タンパク質 SSK1 と結合することが報告されていた (Matsumoto et al., 2008, 2012; Kakui et al., 2011)。

これら間接的な示唆に基づけば、SLFLs は GI 候補のひとつとして考えられるものの、SLFLs を GI と認める積極的な報告は存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、SLFL1、SLFL2、SLFL3 が GI 候補としてふさわしいかを検証すべく、それらが GI に期待される生化学的機能を有するか明らかにすることを目的としている。

詳細としては、まず SLFLs 組換えタンパク質発現に適した系を検討した後、組換え SLFLs の SCF 複合体形成能および非選択的な S-RNase 結合能について *in vitro* での評価を行う。GI が一部冗長的な複数の分子種からなる可能性を考慮し、S-RNase 結合能が選択的であったとしても SCF 複合体形成能を兼ね備えた SLFL はいずれも有力な GI 候補と判断する。最後に、有力な GI 候補 SLFL が S-RNase を分解誘導できるか検証すべく、*in vitro* ユビキチン化試験を行う。

3. 研究の方法

本研究ではカンカオウトウ (*Prunus avium*) をサクラ属自家不和合性のモデル植物として位置づけ、*P. avium* に由来する遺伝子産物を対象に機能調査を行った。

(1) 組み換え PavSLFLs の発現系検討
Pavium S⁴ ハプロタイプに連鎖した PavSLFL1、PavSLFL2、PavSLFL3 を対象に、HA タグないしは GST と融合させた組換えタンパク質の発現を試みた。大腸菌発現では pCold-TF にクローニングしたコンストラクトを BL21 大腸菌株に導入し、低温による発現誘導を行った。無細胞発現では pF3K ベクター (Promega) にクローニングしたコンストラクトを用いて TNT SP6 high-yield wheat germ protein expression system (Promega) による発現を行った。植物体での一過性発現では、pGWB2 にクローニングしたコンストラクトをアグロバクテリウム C58C1 株に導入し、アグロインフィルトレーション法によってタバコ葉に発現させた。

(2) SLFLs の SCF 複合体形成能調査
GST-PavSLFLs、PavSSK1 および PavCul1A-3xHA または PavCul1B-3xHA を無細胞発現系により共発現させた後、グルタチオンビーズによるプルダウンアッセイを行った。また、ユビキチン化能を有するとされる SBP1 を介した non-SCF 複合体形成の可能性も検討すべく、GST-PavSLFLs と PavSBP1-3xHA を同様に共発現させた後プルダウンアッセイを行った。花粉内での SCF 複合体構成要素および PavSBP1 の発現量を比較するため、'ナポレオン' および '佐藤錦' 花粉 cDNA をサンプル、各種構成要素の

PCR産物をクローニングしたTAベクターを標準サンプルとして、qRT-PCRによる絶対定量を行った。

(3) SLFLsのS-RNase結合能調査

大腸菌発現HA-PavSLFLs, タバコ葉発現HA-PavSLFLs, '佐藤錦'(S³S⁶)花柱精製PavS-RNaseおよび'レーニア'(S¹S⁴)花柱精製PavS-RNaseを用いて、免疫沈降を行った。

(4) SLFLによるS-RNaseユビキチン化
HA-PavSLFLsおよびPavSSK1を共発現させたタバコ葉粗抽出物に精製PavS-RNaseを加え、semi-*in vitro*ユビキチネーション試験を行った。

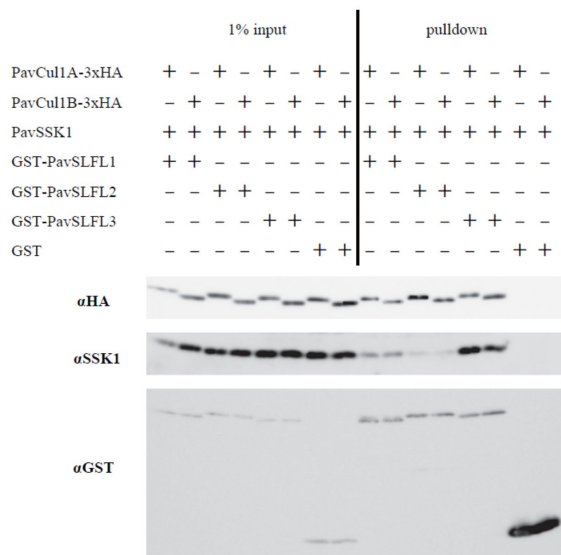
4. 研究成果

(1) 組み換えPavSLFLsの発現系検討

大腸菌発現系、無細胞発現系および植物体における一過性発現のすべての手法で組換えPavSLFLを可溶化発現させることが出来た。

(2) PavSLFLsのSCF複合体形成能調査

PavSLFL1-3はいずれもPavSSK1とともにPavCul1AまたはPavCul1Bと結合したことから、SCF複合体形成能を有することが確認された(第1図)。さらに、PavSLFL1-3はPavSBP1と結合したことからnon-SCF複合体形成能も有することが推察された。花粉内でのこれら複合体構成要素の発現量を比較したところ、PavSSK1はPavSBP1の約500倍、PavCul1AはPavCul1Bの約150倍の発現量であったことから、花粉内においてPavSLFLsはPavSSK1およびPavCul1Aを構成要素とするSCF複合体を主に形成しているものと推察された。



第1図 GST融合SLFLとSCF複合体構成要素のプルダウンアッセイ

(3) SLFLsのS-RNase結合能調査

大腸菌発現PavSLFLsはPavS^{1,3,4,6}-RNaseのいずれとも結合を示さなかった。しかしながら大腸菌発現SLFLは精製収率が低く、ネ

イティブなコンフォメーションをとっていない可能性が考えられた。そこでタバコ葉発現PavSLFLを用いて再調査を行ったところ、PavSLFL1とPavSLFL2にPavS-RNase結合能が認められた。このことからオウトウでは、複数のSLFLがGIとして機能している可能性が推察された。

(4) SLFLによるS-RNaseユビキチン化
タバコ葉発現PavSLFL1およびPavSLFL2についてPavS-RNaseユビキチン化能をsemi-*in vitro*試験によって検証したが、PavSLFL発現に伴ったPavS-RNaseのユビキチン化は観察されなかった。ナス科においてS-RNaseの糖鎖修飾がユビキチン化に阻害的に働くことを示唆する報告がある(Hua and Kao, 2006)。そこで脱糖鎖酵素によるPavS-RNaseの糖鎖除去を試みたが、糖鎖修飾の一部しか除去することが出来ず、また部分的に脱糖鎖したPavS-RNaseを用いた場合もユビキチン化を観察することができなかった。以上のように、いくつかのPavSLFLは有力なGI候補と判断されたものの、そのPavS-RNase分解誘導能までは確認することが出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

松本大生・町田義典・安達栄介・平 智・人工培地上におけるカンカオウトウの花管伸長にS-RNaseが及ぼす影響・園芸学会平成27年度春季大会・2015年3月28, 29日・千葉大学西千葉キャンパス(千葉市)。

Daiki Matsumoto, Ryutaroo Tao. Formation of the SCF complex with the F-box proteins encoded by genes linked to the S locus in Prunus. 7th Rosaceous Genomics Conference. 2014年6月24-26日。シアトル(アメリカ合衆国)。

松本大生・田尾龍太郎。サクラ属のS遺伝子座に連鎖する遺伝子にコードされたF-boxタンパク質のSCF複合体形成能の調査。園芸学会平成26年度春季大会。2014年3月29, 30日。筑波大学(つくば市)。

〔図書〕(計 1件)

平 智・松本大生。杉葉堂印刷。やまがたの在来梅のはなし。2014。42-46。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 大生 (MATSUMOTO, Daiki)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：30632129

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし