

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18683

研究課題名(和文)構造から迫るアブラナ科植物の自家不和合性機構

研究課題名(英文)Structural basis of the self- and non-self-recognition in plant self-incompatibility

研究代表者

村瀬 浩司 (Murase, Kohji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50467693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の多くは自らの花粉を拒絶し、他個体由来の花粉でのみ受精す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花粉側および雌しべ側のS遺伝子型が一致したとき花粉の拒絶が起こる。この反応は雌しべの受容体キナーゼSRKと花粉由来のリガンドSP11とのS特異的な相互作用により行われている。本研究ではこの自他認識メカニズムの解明を目的として、X線結晶構造解析の手法を用いてSRK-SP11の構造決定を試みた。本研究では昆虫細胞の系を用いてSRK分子を大量発現、精製することに成功した。また、SRKとSP11を混合した条件でSRK-SP11複合体の結晶作製に成功し、構造決定に大きく前進した。

研究成果の概要(英文)：Many flowering plants have self-incompatibility for promotion of out-crossing to maintain the genomic diversity. In Brassica, pistil factor SRK and pollen factor SP11 coding in the S-locus control the self-incompatibility reaction. This pollen rejection is triggered by S-haplotype specific SRK-SP11 interaction. To study the mechanism of S-haplotype specific recognition of SP11 by SRK, we tried to structure determination of SRK-SP11 complex by X-ray crystallography. Here, he successfully expressed the recombinant SRK protein in insect cells, and obtain the large amount of purified SRK protein. We also obtained the protein crystals of SRK-SP11 complex. Our data will contribute to the determination of SRK-SP11 structure and understanding the mechanism of self-incompatibility in plants.

研究分野：農芸化学

キーワード：植物

## 1. 研究開始当初の背景

植物の多くは1つの花に雄しべと雌しべをもつ両性花であり、自家受粉しやすい性質をもつ。そのため植物の多くは自らの花粉を拒絶し、他個体由来の花粉でのみ受精する「自家不和合性」と呼ばれる機構を進化させてきた (Takayama and Isogai, Annu. Rev. Plant Biol. 56, 467, 2005)。自家不和合性は  $S$  と呼ばれる一遺伝子座の複数の対立遺伝子 ( $S_1, S_2, \dots, S_n$ ) によって支配され、花粉側および雌しべ側の  $S$  遺伝子型が一致したとき、花粉の拒絶が起こる (図1)。アブラナ科植物の自家不和合性では  $S$  遺伝子座にコードされる雌しべ側決定因子として *SRK* 遺伝子が (Takasaki et al., Nature 403, 913, 2000)、花粉側決定因子として *SP11* 遺伝子が同定されており (Suzuki et al., Genetics 153, 391, 1999; Takayama et al., PNAS 97, 1920, 2000)、花粉由来のリガンドである *SP11* が  $S$  遺伝子型特異的に受容体キナーゼである *SRK* と結合して、*SRK* の細胞内キナーゼドメインをリン酸化 (活性化) することにより、花粉拒絶反応を誘導することが明らかとされている (Takayama et al., Nature 413, 534, 2001) (図2)。また、申請者は *SRK* の下流で機能する膜アンカー型タンパク質キナーゼ *MLPK* が *SRK* と相互作用して自家不和合性シグナルを伝えていることを明らかにしている (Murase et al., Science 303, 1516, 2004; Kakita et al., Plant Cell 19, 3961, 2007)。

このように自己花粉の認識に関わる  $S$  遺伝子産物が特定され、そのシグナル伝達の分子機構がタンパク質キナーゼのリン酸化リレーによるものであることが判明しつつあるが、一方で次のような課題が残されている。

1. *SRK* はなぜ同じ  $S$  遺伝子型の *SP11* のみを認識できるのか?
2. *SRK* はリガンドと結合し、自己リン酸化するとなぜ活性化されるのか?

## 2. 研究の目的

本研究ではX線結晶構造解析によってリガンドを認識する *SRK* の細胞外領域と *SP11* の複合体構造および *SRK* の細胞内キナーゼドメインについて活性型と不活性型の両立体構造を決定することにより、受容体のリガンド認識と細胞内情報伝達のみカニズムについてタンパク質構造化学的に解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では *SRK* の細胞外ドメインと細胞内ドメインを分けてリコンビナントタンパク質として大腸菌、もしくは昆虫細胞で大量発現させたのち、各種クロマトグラフィーによって精製した。精製した *SRK* タンパク質は濃縮した後、結晶化スクリーニングによってタンパク質が結晶化する条件を探索した。結晶が得られたら、結晶が大きくなる条件をさらに詳細に検討し、十分な大きさに成長させた。タンパク質の結晶は液体窒素で凍結させた後、*SPring-8* 等高輝度放射光施設のシンクロトロンを用いて、反射データを得た。

## 4. 研究成果

*SRK* の細胞内キナーゼドメインは不活性化型の結晶について六角柱型の結晶が得られていた。本研究では結晶を成長させるための条件検討を行い、結晶を数百ミクロンまで成長させることに成功した。これらの結晶を用いて *SPring-8* にてデータ収集を行ったところ、最も良い結晶で、約4オングストロームの分解能をもつ反射データを得ることができた。

また、*SRK* のキナーゼドメインは極めて疎水性で、大腸菌で発現させると凝集する性質をもっているが、分子モデリングによる分子表面アミノ酸の解析とその変位導入により、キナーゼ活性を保持した状態で、大腸菌で安定に発現させることに成功しており、それらの結果をまとめて、Protein Expression &

Purification 誌に発表した。

SRK の細胞外ドメインは昆虫細胞である Sf-9 細胞とバキュロウイルスを用いたタンパク質発現系で微量に発現させることに成功した。SRK の細胞外ドメインは FLAG タグの融合タンパク質として細胞外に分泌タンパク質として発現させ、その培養液を限外ろ過によって濃縮し、FLAG アガロースを用いてアフィニティー精製を行った。さらにゲルろ過イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、単一のタンパク質として得ることができた。収率は 30-40 マイクログラム/L であり、250L の培地から約 5 mg の精製タンパク質を得ることができた。MALDI-TOF-MS 解析によって SRK タンパク質の分子量を測定したところ、計算分子量よりも約 2,200 Da ほど大きい値を示したため、糖鎖による修飾を受けていることが予想された。

SRK について結晶化スクリーニングを行ったが、SRK 単体では成長する結晶が得られる条件を見つけることができなかった。一方、SRK と SP11 を混合して結晶化スクリーニングに供したところ、22 条件でダイヤモンド型もしくは棒状の結晶を得ることができた。結晶が得られた条件を詳細に検討して、結晶が大きくなる条件を探索したところ、いくつかの条件で約 300 ミクロンの結晶を得ることができるようになった。これらの結晶を集めて SDS-PAGE に供したところ SRK と SP11 タンパク質と同じサイズにバンドが検出されたため、この結晶は SRK-SP11 複合体の結晶であることが予想された。また、SRK と SP11 の量比がおおむね 1 : 1 であったことから、等モル比で複合体を形成していると予想された。

今後はこの複合体結晶に X 線をあてることによって反射データを回収し、構造決定へと繋げていきたい。

## 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 6 件 )

( 1 ) Hirano, Y., Nakagawa, M., Suyama, T., Murase, K., Shirakawa, M., Takayama, S., Sun, T.-P., and Hakoshima, T. Structure of the SHR-SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nat. Plants*, **3**, 17010 (2017). doi: 10.1038/nplants.2017.10. ( 査読有り )

( 2 ) Murase, K., Shigenobu, S., Fujii, S., Ueda, K., Murata, T., Sakamoto, A., Wada, Y., Yamaguchi, K., Osakabe, Y., Osakabe, K., Kanno, A., Ozaki, Y., and Takayama, S. MYB transcription factor gene involved in sex determination in *Asparagus officinalis*. *Genes Cells*, **22**, 115-123 (2017). doi: 10.1111/gtc.12453. ( 査読有り )

( 3 ) Murase, K., Hirano, Y., Takayama, S., and Hakoshima, T. Efficient expression of SRK intracellular domain by a modeling-based protein engineering. *Protein Expr. Purif.*, **131**, 70-75 (2017). doi: 10.1016/j.pep.2015.09.020. ( 査読有り )

( 4 ) Yasuda, S., Wada, Y., Kakizaki, T., Tarutani, Y., Miura-Ueno, E., Murase, K., Fujii, S., Hioki, T., Shimoda, T., Takada, Y., Shiba, H., Takasaki-Yasuda, T., Suzuki, G., Watanabe, M., and Takayama, S. A complex dominance hierarchy is controlled by polymorphism of small RNAs and their targets. *Nat. Plants*, **3**, 16206 (2016). doi: 10.1038/nplants.2016.206. ( 査読有り )

( 5 )Kubo, K-I., Tsukahara, M., Fujii, S.,  
Murase, K., Wada, Y., Entani, T., Iwano,  
M., and Takayama, S. Cullin1-P is an  
Essential Component of Non-Self  
Recognition System in  
Self-Incompatibility in *Petunia*. *Plant  
Cell Physiol.*, **57**, 2403-2416 (2016). doi:  
10.1093/pcp/pcw152. ( 査読有り )

( 6 )Murase, K., Sugai, Y., Hayashi, S.,  
Suzuki, Y., Tsujii, K., Takayama, S.  
Generation of transgenic *Linum perenne* by  
*Agrobacterium*-mediated transformation.  
*Plant Biotech.*, **32**, 349-352 (2015). doi:  
10.5511/plantbiotechnology.15.1109a.  
( 査読有り )

〔学会発表〕(計 2 件)

( 1 )村田 亨謙、阪本 愛、村瀬 浩司、  
重信 秀治、藤井 壮太、上田 和季、和  
田 七夕子、山口 勝司、刑部 祐里子、  
刑部 敬史、菅野 明、尾崎 行生、高山  
誠司、アスパラガスにおける性染色体上の  
遺伝子解析、第 39 回日本分子生物学会、  
神奈川県横浜市、パシフィコ横浜、2016  
年 11 月 30 日。

( 2 )阪本 愛、村瀬 浩司、重信 秀治、  
藤井 壮太、上田 和季、村田 亨謙、和  
田 七夕子、山口 勝司、刑部 祐里子、  
刑部 敬史、菅野 明、尾崎 行生、高山  
誠司、アスパラガスにおける性決定遺伝子  
の進化、第 39 回日本分子生物学会、神奈  
川県横浜市、パシフィコ横浜、2016 年 11  
月 30 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://bsw3.naist.jp/takayama/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村瀬 浩司 (Murase, Kohji)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科  
助教  
研究者番号：50467693