

令和元年5月17日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06184

研究課題名(和文) サクラ属自家不和合性に特異な「自己認識」システムの分子機構解明

研究課題名(英文) The study of the self-recognition molecular mechanism in the Prunus-specific S-RNase based self-incompatibility

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) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：サクラ属に特異なS-RNase依存性自家不和合性にみられる、花粉側因子SFBによる自己特異的なS-RNaseの毒性発揮メカニズムの解明を目的とし、1)組換えS-RNaseと結合する花粉管タンパク質の網羅同定、2)和合・不和合の受粉雌蕊および培養花粉管におけるS-RNaseおよびS-RNase無毒化因子候補のユビキチン化の調査を行った。本調査により、S-RNaseの毒性発揮に關与する可能性のあるタンパク質およびS-RNase無毒化因子候補と考えられるSCF複合体を同定することができた。一方、和合・不和合花粉管でユビキチン化に差異があると想定したタンパク質についてはユビキチン化を検出できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本調査によって、未同定であったS-RNase無毒化因子がSLFLおよびSFBLが形成するSCF複合体である可能性が示唆された。また、自家不和合反応に必須であることが変異体研究によって示されていたMGSTがS-RNaseと結合することを示すと同時に、不和合反応に關与する可能性のある新規花粉タンパク質を同定した。加えて調査過程において、これまで発現が困難であった不和合性關連タンパク質の発現系を構築した。これらの成果はサクラ属自家不和合性に特異な自己認識メカニズムの更なる理解につながるものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of the self-specific recognition of S-RNase by the pollen determinant SFB to exert its cytotoxicity in the Prunus-specific S-RNase-based self-incompatibility (SI), we conducted 1) identification of the pollen-tube proteins binding to the recombinant S-RNase by mass-spectrometry, 2) investigation of the poly-ubiquitination of the SI-related proteins in the (in)compatible pollinated pistils and the in vitro cultured (in) compatible pollen tubes. As a result, candidates of the pollen tube proteins involved in exerting the S-RNase cytotoxicity and those of the SCF complexes involved in detoxification of S-RNase in compatible pollen tubes were identified. On the other hand, we could not detect the poly-ubiquitination of the SI-related proteins in both of the (in)compatible pollinated pistils and the in vitro cultured (in)compatible pollen tubes.

研究分野：果樹園芸

キーワード：サクラ属果樹 自家不和合性 S-RNase SLFL SFBL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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雌ずい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 *Plant Cell Physiology*, 2003 *Plant Cell*)。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。同様に S-RNase を雌ずい側因子 F-box タンパク質を花粉側因子とする自家不和合性はナス科、オオバコ科およびサクラ属と近縁なバラ科リンゴ連でも見つかっており、このような自家不和合性は S-RNase 依存性自家不和合性と呼ばれている。ただし、SLF と命名されたナス科やオオバコ科の花粉側因子 F-box タンパク質は SFB とオルソログではないことが系統解析によって示唆されていた。その後、S-RNase 依存性自家不和合性の分子機構研究はナス科植物において精力的に進められ、「花粉側因子 F-box タンパク質は非自己 S-RNase の分解誘導に機能する一方で、自己 S-RNase は認識できない」とする非自己認識モデルが実験的に示された(Sijacic et al., 2004 *Nature*; Kubo et al., 2010 *Nature*)。オオバコ科やバラ科リンゴ連の S-RNase 依存性自家不和合性もまた、この非自己認識モデルに従う可能性が示唆されている。しかしながらこれに反してサクラ属では、SFB が欠失した変異体は和合化する事例が多く報告されており、非自己認識モデルが適用できないことが指摘されてきた(Tao and Iezzoni, 2010 *Scientia Horticulturae*)。すなわち、非自己認識モデルに従えば SFB が変異すると花粉は他家不和合化するはずであるのが、実際は他家和合性を維持しつつ、自家和合化している点が矛盾していたのである。そこでサクラ属では、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(general inhibitor, GI)が存在すること、SFB は自己 S-RNase 毒性の発揮に機能することが提唱された。ただし、SFB、GI および S-RNase がどのような分子間相互作用を行うことで自家不和合性を実現しているかについては謎のままであった。

研究に着手するにあたり、研究代表者はサクラ属に特異な S-RNase 依存性自家不和合性を説明するモデルとして、SFB による自己特異的 GI 分解モデルを提唱した(Matsumoto and Tao, 2016 *Horticulture Journal*)。本モデルでは、「SFB は自己 S-RNase と GI の複合体を認識し、GI をユビキチン化し分解誘導することで、自己花粉の S-RNase 解毒能を失わせる」と予想している。また、ナス科、オオバコ科、リンゴ亜連の花粉側遺伝子のオルソログであることが示唆されていた花粉発現タンパク質 S-locus F-box protein like 1, 2, 3(SLFL1, 2, 3)について組換えタンパク質を作出し、その S-RNase 結合能を調査することによって、SLFL2 を中心とした SLFL タンパク質群が GI としてふさわしい生化学的機能を有していることを見出した(Matsumoto and Tao, 2016 *Plant Molecular Biology*)。

2. 研究の目的

自己特異的 GI 分解モデルに従えば、和合花粉管内では S-RNase が SLFL2 などの GI 候補によってユビキチン化され分解誘導されるのに対して、不和合花粉管内では GI が SFB によってユビキチン化され分解誘導されると考えられる。しかしながら、GI として機能する遺伝子はいくつあるのか、SFB - GI - S-RNase の 3 者間相互作用は和合組み合わせと不和合組み合わせの間で差異があるのか、実際に和合花粉特異的な S-RNase のポリユビキチン化および不和合花粉特異的なポリユビキチン化が起こっているのかは明らかではない。本研究では、自己特異的 GI 分解モデルを検証すべく、これらの点について明らかにすることを目的とした。

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* を材料として調査を行った。

(1) オウトウゲノム中の花粉発現 SLFL および SFB-like 遺伝子群の探索、およびその S-RNase 結合能の調査

カンカオウトウ「佐藤錦」(*S³S⁶*)のゲノムにコードされている SLF 様タンパク質および SFB 様タンパク質のアミノ酸配列を Blast-P 検索によって収集し、NJ 法によって系統解析を行った。また、公開されている「佐藤錦」花粉の RNA-seq データを用いて、オウトウ SLF 様遺伝子および SFB 様遺伝子の花粉における発現を調査した。花粉で発現していることが確認された PavSLFL6、PavSLFL7A、PavSFBL1、PavSFBL2 について、HA タグ融合遺伝子配列を pGWB2 ベクターにクローニングし、アグロインフィルトレーション法によって SFB の SCF 複合体構成要素である Skp1 様タンパク質 PavSSK1 遺伝子とともにタバコ葉に発現させた。発現させた HA タグ融合タンパク質と花柱から粗精製した S-RNase との結合を、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降によって調査した。GST-PavSFBL2、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い、SFBL2 の SCF 複合体形成能を調査した。

(2) 組換え S-RNase と結合するオウトウ花粉タンパク質の網羅同定

カイコ・バキュロウイルス発現系により DDDDK タグ融合組換え S⁶-RNase を発現させ、精製した。‘レーニア’ (S¹S⁴) の培養花粉管から粗タンパク質を抽出し、組換え S-RNase とともにインキュベートし、抗 DDDDK 抗体を用いて免疫沈降を行った。Nano LC-MS/MS および MASCOT ソフトウェアを用いて、免疫沈降物に含まれるタンパク質を同定した。

(3) 和合・不和合受粉雌ずいおよび和合・不和合培養花粉管におけるユビキチン化タンパク質の分析

寒天挿した‘佐藤錦’雌ずいに‘佐藤錦’花粉または‘レーニア’花粉を受粉し、20 で静置した。受粉 16 時間後の不和合受粉雌ずい、受粉 9 時間後の和合受粉雌ずいから花柱の頂部 1/3 を採取し、-70 に凍結保存した。また、陽イオンクロマトグラフィーによって粗精製した‘佐藤錦’ S-RNase を 0.8 μg/μl の濃度で含む液体花粉発芽培地中で、‘佐藤錦’花粉または‘レーニア’花粉を 20 で培養した。培養後 6 時間に和合および不和合花粉管を回収し、-70 に凍結保存した。これらのサンプルから、RIPA バッファーを用いて粗タンパク質を抽出した。粗タンパク質に抗ポリユビキチン抗体アガロースを加え、免疫沈降によってポリユビキチン化タンパク質を回収した。ウェスタンブロットによって回収したユビキチン化タンパク質に S-RNase および SLFL2 が含まれるか調査した。

(4) 和合・不和合培養花粉管に含まれる S-RNase および SLFL2 量の経時的変化

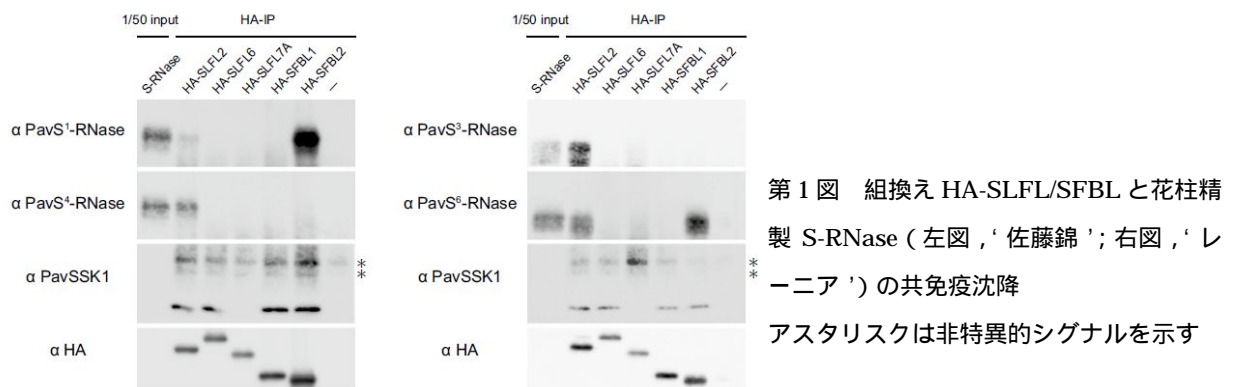
粗精製 S-RNase を含む液体花粉発芽培地上で‘佐藤錦’花粉および‘レーニア’花粉を 20 で培養し、培養 1.5, 3, 4.5, 6 時間後に花粉管を回収した。花粉発芽培地で洗浄した花粉管から TBST バッファーを用いて粗タンパク質を抽出した。ウェスタンブロットによって粗タンパク質中の S-RNase および SLFL2 のシグナル強度を定量した。

4. 研究成果

(1) オウトウゲノム中の花粉発現 SLFL および SFB-like 遺伝子群の探索、およびその S-RNase 結合能の調査

オウトウゲノム中には 14 の SLF 様遺伝子、6 つの SFB 様遺伝子がコードされていた。そのうちモモおよびウメゲノムにも保存されていた遺伝子は SLF 様遺伝子が 7 つ (SLFL1-8)、SFB 様遺伝子が 5 つであった (SFB1-5)。これらの保存された遺伝子のうち、‘佐藤錦’花粉で発現の認められたものは SLFL1-3、SLFL6、7、SFBL1 および SFBL2 であった。

SLFL6、SLFL7 および SFBL1、SFBL2 とオウトウ花柱より粗精製した S¹、S³、S⁴、S⁶-RNase の結合を調査したところ、S-RNase 結合能を持っていたのは SFBL2 のみであった (第 1 図)。SFBL2 は S¹、S⁶-RNase 結合能を有することが明らかとなった。SFBL2 がタンパク質分解に機能できるか明らかにするため、その SCF 複合体形成能を調査した。調査の結果 SFBL2 は SSK1 を介して Cul1A および Cul1B のどちらの Cul1 ホモログとも SCF 複合体を形成できることが明らかとなった。このことから、サクラ属自家不和合性におけるジェネラルインヒビター機能は SLFL/SFBL タンパク質群が冗長的に担うことが示唆された。



第 1 図 組換え HA-SLFL/SFBL と花柱精製 S-RNase (左図, ‘佐藤錦’; 右図, ‘レーニア’) の共免疫沈降
アスタリスクは非特異的のシグナルを示す

(2) 組換え S-RNase と結合するオウトウ花粉タンパク質の網羅同定

‘レーニア’ (S¹S⁴) の培養花粉管の粗抽出タンパク質に対して組換え DDDDK-タグ S⁶-RNase をベイトとした共免疫沈降を行い、和合花粉管内で S-RNase と結合する花粉管タンパク質の網羅同定を試みた。免疫沈降物を MS 解析したところ、SLFL2、SLFL6、SFBL2 とこれらの SCF 複合体構成要素である SSK1、Cul1A が S-RNase 結合タンパク質として同定されたことに加え、機能喪失すると自家和合化することが知られている MGST および機能未知の DnaJ 様タンパク質が同定された (第 1 表)。

次に ‘レーニア’ (S¹S⁴) の培養花粉管の粗抽出タンパク質に対して組換え DDDDK-タグ S⁴-RNase をベイトとした共免疫沈降を行い、SFB 抗体を用いたウェスタンブロットによって不和合花粉管特異的に SFB が S-RNase と結合するか調査を試みたものの、SFB と S-RNase

の自己特異的な結合は確認できなかった。ただし、今回作出した SFB 抗体はウェスタンプロットにおいて無細胞発現組換え SFB を特異的に認識したものの、花粉粗抽出物をサンプルとしたときには特異的なシグナルが認められなかった。このことから、組換え S-RNase と内生 SFB の結合が確認できなかった原因としては、内生 SFB の存在量がわずかである、または十分に抽出できていない可能性が疑われた。

第 1 表 DDDDK-タグ S⁶-RNase と結合する ‘レーニア’ (S¹S⁴) の培養花粉管タンパク質の MS 解析結果

Proteins preferentially identified using co-IP ^a	Accessions	Deduced molecular mass (kDa)	Spectra in co-IP	Spectra in control ^b	NSAF in co-IP ^c (%)	NSAF in control (%)
PavSLFL2	XP_021803309.1	49	279	0	2.65	0.00
PavSLFL6	XP_021821224.1	49	247	0	2.35	0.00
PavSSK1-like	XP_021802263.1	21	159	7	3.53	0.12
PavSFBL2	XP_021817233.1	44	142	0	1.50	0.00
Chaperone protein DnaJ10-like	XP_021828002.1	41	135	0	1.53	0.00
PavMGST	XP_021816798.1	24	110	0	2.13	0.00
PavSSK1	XP_021834044.1	21	102	0	2.26	0.00
PavCul1A	XP_021820063.1	86	78	24	0.42	0.10
Coatomer subunit beta ² -2-like	XP_021807152.1	103	12	0	0.05	0.00
BrefeldinA-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 5	XP_021804503.1	196	11	0	0.03	0.00
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	XP_021805383.1	135	10	0	0.03	0.00
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	XP_021819298.1	62	8	0	0.06	0.00
Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic isoform X1	XP_021833799.1 XP_021833800.1 XP_021833801.1	164	8	0	0.02	0.00
Alpha-amino adipic semi-aldehyde synthase	XP_021804606.1	117	7	2	0.03	0.01
Exocyst complex component SEC6	XP_021829536.1	73	7	2	0.04	0.01
Exocyst complex component SEC5A-like	XP_021809580.1	124	6	0	0.02	0.00
SKP1-like protein 1A	XP_021815668.1	18	5	0	0.13	0.00
Lon protease homolog 1, mitochondrial-like isoform X1	XP_021819219.1 XP_021819220.1 XP_021819221.1 XP_021821299.1	112	5	0	0.02	0.00
PavS ⁶ -RNase	XP_021802050.1	28	217	156	3.61	2.08
Total number of spectra matching			13,958	17,281	100.00	100.00

^aProteins had at least five spectral counts and were detected with a fourfold or more increase based on NSAF values

^bControl was a mixture of pollen proteins bound non-specifically to beads and the input of the recombinant S⁶-RNase

^cNormalized spectral abundance factor (NSAF) was calculated as follows: (spectral counts/molecular weight)/Σ(spectral counts/molecular weight)_N

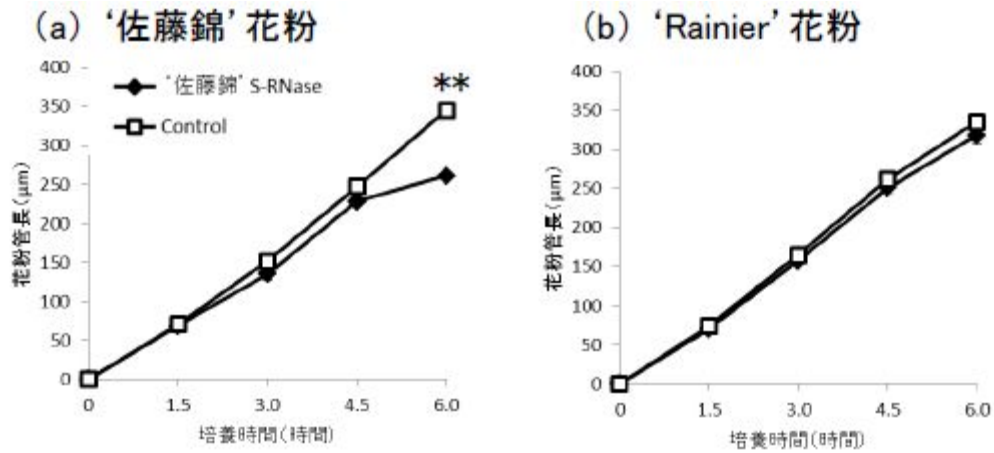
(3) 和合・不和合受粉雌ずいおよび和合・不和合培養花粉管におけるユビキチン化タンパク質の分析

受粉 16 時間後の不和合受粉雌ずいならびに受粉 9 時間後の和合受粉雌ずいでは花粉管長が同等であった(花柱全長の約 30%)。これらの受粉雌ずいサンプルから、免疫沈降によってポリユビキチン化タンパク質を回収した。回収サンプルに含まれる S-RNase をウェスタンプロットによって検出しようと試みたものの、どちらのサンプルからもポリユビキチン化 S-RNase は検出されなかった。さらに、両サンプルの粗タンパク質に含まれる花粉特異的なタンパク質 SLFL2 を検出したところ、得られたシグナルは微弱なものであった。このことから、花粉内部のタンパク質の挙動をとらえるためには受粉雌ずいはサンプルとして適切でないと考えられた。

次に、粗精製 ‘佐藤錦’ S-RNase を含む液体花粉発芽培地で培養した培養 6 時間後の ‘佐藤錦’ 花粉および ‘レーニア’ 花粉を材料として、同様にポリユビキチン化タンパク質を回収し、S-RNase 抗体および SLFL2 抗体を用いたウェスタンプロットを行った。しかしながら、S-RNase および SLFL2 のポリユビキチン化は和合花粉管・不和合花粉管のどちらにおいても検出されなかった。したがって自己特異的な GI 分解モデルにおいて予測していた、和合花粉特異的な S-RNase のポリユビキチン化および不和合花粉特異的な GI 候補 SLFL2 のポリユビキチン化は確認できなかった。

(4) 和合・不和合培養花粉管に含まれる S-RNase および SLFL2 量の経時的変化

‘佐藤錦’ S-RNase 含有培地上で ‘佐藤錦’ 花粉および ‘レーニア’ 花粉を培養し、培養 1.5、3、4.5、6 時間後の花粉管長を計測したところ、培養後 6 時間後において ‘佐藤錦’ 花粉の花粉管長が有意に短くなった(第 2 図)。培養花粉管中の S-RNase および SLFL2 をウェスタンプロットによって検出したところ、どちらについても培養期間を通して不和合花粉管と和合花粉管の間にシグナル強度の違いは認められなかった。ただし、花粉表面に付着した S-RNase 量が細胞質内に取り込まれた S-RNase 量を大きく上回っていた可能性があること、また花粉の発芽率がからカンカアウトウにおける S-RNase の毒作用回避機構を解明するためには、花粉管内における S-RNase の局在について調査する必要があると考えられる。



第 2 図 粗精製 '佐藤錦' S-RNase が培地上での '佐藤錦' 花粉 (a) および 'Rainier' 花粉 (b) の花粉管伸長に及ぼす影響

値は 1 反復あたり 60 本の花粉管長の平均値 ± 標準誤差を示す (n=3)

**は 1%水準で有意差があることを示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Daiki Matsumoto, Ryutaro Tao (2019) Recognition of S-RNases by an S locus F-box like protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the *Prunus*-specific self-incompatibility system. *Plant Molecular Biology*. in press. DOI: 10.1007/s11103-019-00860-8

〔学会発表〕(計 1 件)

松本大生・沼沢 光・笠井美里. カンカオウトウの培養和合花粉管および不和合花粉管における S-RNase 量の比較. 園芸学会平成 30 年度秋季大会. 2018 年 9 月 22, 23 日. 鹿児島大学 (鹿児島市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。