

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14727

研究課題名（和文）植物の花粉管ガイダンスを司る受精因子の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural biology of attractant peptide recognition in plant pollen tube guidance

研究代表者

石田 英子（Ishida, Hanako）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：70563295

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）：植物の花粉管伸長のメカニズムを解明するために、雌しべの助細胞から分泌される誘引ペプチド（LURE）と花粉管先端に存在するLURE受容体の構造生物学的研究を行った。複数種類のLUREペプチドおよびLURE受容体を用いて発現と精製条件の検討を行い、さまざまな組み合わせで複合体の結晶化を行ったが、構造決定には至らなかった。結晶の品質を向上させるために発現用の宿主とコンストラクトの検討を行い、精製タンパク質の結合活性をプルダウン実験で確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種子植物の受粉において、雄しべで形成された花粉が雌しべの柱頭に付着すると、花粉から花粉管が伸長し胚のうへと導かれる。この花粉管の伸長は古くから知られた現象ではあったが、なぜ花粉管が迷わずに卵細胞まで導かれるのかについてのメカニズムは解明されていなかった。最近、花粉管の先端に存在する受容体が胚のうから分泌されるペプチドを認識して、進むべき胚のうの方向を感知していることが明らかになった。受粉のメカニズムを解明することは食物生産においても有用である。本研究では分泌ペプチドとそれを認識する受容体の相互作用の解明を目指し、各タンパク質の精製と結晶化を検討した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of pollen tube guidance in plants, we conducted the structural studies of secreted peptides LUREs from ovule and pollen receptors which interact with LURE peptides. We examined expression and purification methods for a variety of LURE peptides and LURE receptors. In this study, we tried co-crystallization of the various LURE peptide-receptor complexes but it was not successful. To improve the quality of crystals, we examined expression hosts and constructs and confirmed binding ability by pull-down assay.

研究分野：構造生物学

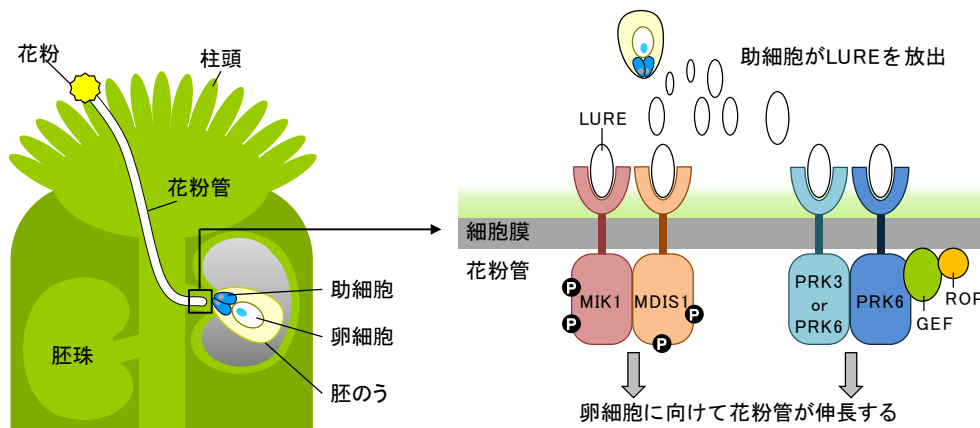
キーワード：植物の受精

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精は有性生殖において極めて重要な生命現象であり、植物においては種子植物の受粉に見出すことができる。雄しべで形成された花粉が雌しべの柱頭に付着すると、花粉から花粉管が伸長し卵細胞を有する胚のうへと導かれる(花粉管ガイダンス、図1)。花粉管の誘導には胚のう中に存在する助細胞が分泌する LURE ペプチドが関わっており、花粉管先端に存在する LURE 受容体が LURE を認識することで卵細胞に向かって伸長することができる。

近年の研究で、PRK6、3 および MDIS/MIK の 2 パターンの LURE 受容体タンパク質がシロイヌナズナにおいて同定された。また、LURE ペプチドはシロイヌナズナでは 6 種類存在することが知られている。しかし、なぜ LURE 受容体と LURE ペプチドは同一植物内で数種類ずつ存在しているのか、なぜ異なる種間では花粉管ガイダンスは起きないのか、など不明な点が多い。



2. 研究の目的

本申請課題では、LURE-LURE 受容体の複合体の X 線結晶構造解析を研究の中核として、それらの間の相互作用解析を詳細に行うことで、花粉管ガイダンスにおける花粉管誘因因子の認識機構と結合特異性に関する構造基盤を構築することを目的とする。シロイヌナズナの LURE とその受容体である MIK、MDIS、PRK を対象とし、相互作用解析および個々のタンパク質の構造解析を進めるとともに、様々な組み合わせでの LURE ペプチド-LURE 受容体の複合体 (MIK1/MDIS1/LURE 複合体、PRK3/PRK6/LURE 複合体など) の構造を明らかにし、花粉管ガイダンスの詳細な分子機構の解明を目指した。

被子植物の種子は主食である穀物としても利用されており、受精に始まる一連の種子形成機構の解明は、生産的、育種的にも我々人類に大きな発展をもたらすものと考えられる。また、LURE ペプチド、LURE 受容体の発見はいずれも日本発の研究成果であり、その観点からも本申請課題が果たす役割は大きい。

3. 研究の方法

本申請課題では、LURE ペプチド-LURE 受容体の複合体の構造解析を目指す。結晶化試料は、昆虫細胞を用いた発現系で、LURE ペプチドとしてシロイヌナズナの AtLURE1.1~1.6 の 6 種類のタンパク質を、LURE 受容体として PRK6、PRK3、MDIS1、MDIS2、MIK1、MIK2 の 6 種類のタンパク質を調製する。X 線結晶構造解析では、各タンパク質の発現領域や糖鎖の切断を検討し、個々のタンパク質の構造解析を進めるとともに、様々な組み合わせでの LURE ペプチド-LURE 受容体の複合体の構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 発現系および発現領域の検討

ショウジョウバエ由来 S2 細胞を用いて AtLURE1.1~1.6 全長および、PRK6、3、MDIS1、2、MIK1、2 の細胞外ドメイン (図 2) の発現を確認した。いずれのタンパク質においても発現が確認でき、PRK3、6 および MIK1、2 においては高純度かつ十分な量の試料を得ることに成功した。AtLURE および MDIS1、2 は精製過程で凝集する傾向にあったため、発現系と発現領域の検討を行った。

S2 細胞で発現させた AtLURE は、C 末端に ProteinA タグを付加した状態では精製が可能であったが、タグを切断すると凝集する傾向にあった。そこで、タグを切断せずに LURE 受容体タンパク質と混合し、その後タグを切断する方法を検討した。

また、Wang らは AtLURE1.2 ペプチドを大腸菌で発現させ、不溶性画分からリフォールディングによって試料調製を行っていたことから (Wang, T. *et al.*, *Nature*, 2016)、本研究においてもリフォールディングで AtLURE1.1~AtLURE1.6 のペプチドを得た。

MDIS1, 2 はいずれもタグ切断の有無にかかわらず凝集する傾向にあったため、発現領域の検討を行った。MDIS1, 2 は細胞外ドメインに 4 つの LRR (Leucine-rich repeat) ドメインを持ち、LRR ドメインと膜貫通領域との間の約 200 残基はほとんど二次構造を持たないと予測されている。MDIS の 4 つの LRR ドメインを含むようなコンストラクトを複数種検討した結果、MDIS1 では残基番号 25-201、MDIS2 では残基番号 25-195 で良好な発現を示し、ゲルろ過の結果、凝集のない画分を得ることに成功した。

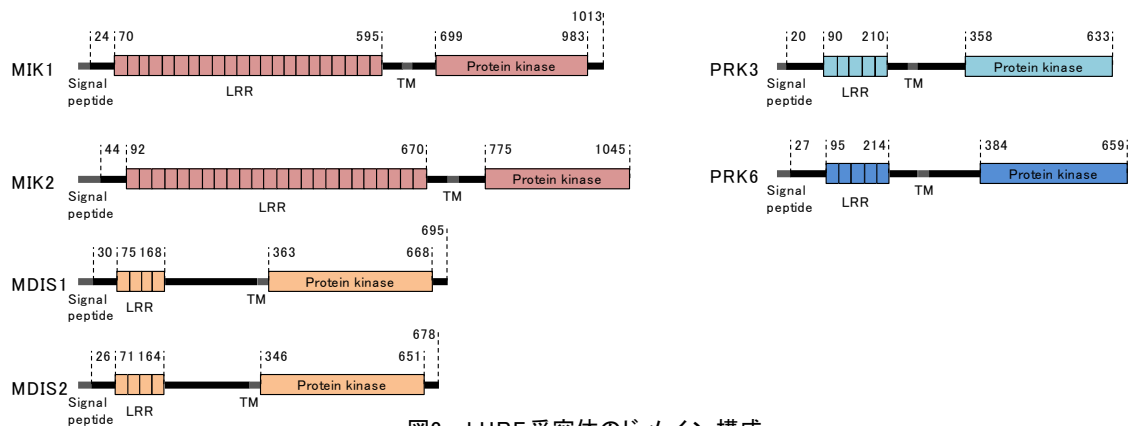


図2 LURE 受容体のドメイン構成

(2) タンパク質の精製

結晶化を目指して培養条件、精製に使用するカラムやバッファーの条件を検討した。C 末端に ProteinA タグを付加した AtLURE、PRK、MDIS、MIK のそれぞれの S2 細胞安定発現株を培養し、7~10 日間発現誘導を行った。培養上清を回収し、IgG カラムアフィニティークロマトグラフィー後、必要に応じてタグと糖鎖の切断を行い、その後ゲル濾過カラムにより精製した。最終的に SDS-PAGE でほぼ単一のバンドとなるまで精製することができた (図 3)。また、AtLURE は大腸菌でも発現させ、不溶性画分からリフォールディングにより試料を得た。AtLURE は保存されたシステイン残基によって分子内で S-S 結合を形成しているため、リフォールディング時に GSH/GSSG で S-S 結合の形成を促進し、さらに調製した試料は非還元条件で SDS-PAGE を行い、分子間で誤った S-S 結合を形成していないことを確認した。また、AtLURE は精製過程で沈殿を生じやすい傾向にあったが、塩強度を下げることである程度抑制できることが分かった。

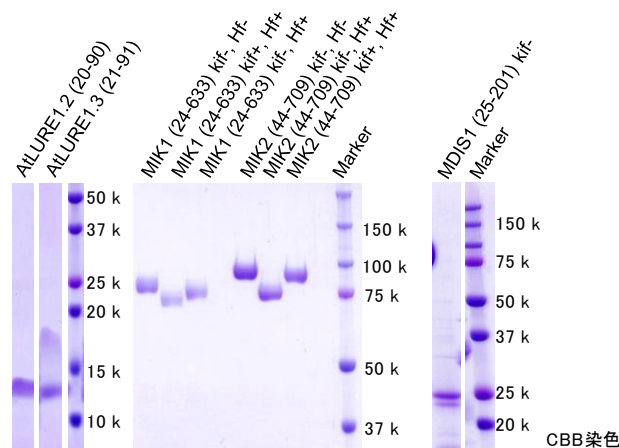


図3 精製タンパク質のSDS-PAGE

(3) 複合体形成確認

得られた LURE ペプチドと LURE 受容体との結合をプルダウンにより確認した。その結果、MIK1, 2/MDIS1, 2/AtLURE1.2 で結合が確認でき、特に MIK2/MDIS1/AtLURE1.2 で最もよく結合が確認できた (図 4)。

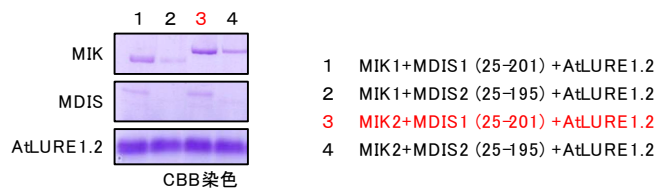


図4 プルダウンによるLUREペプチド-LURE受容体の結合確認

(4) 結晶化および構造解析

得られた精製試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。それぞれの精製タンパク質を単独で結晶化スクリーニングを行うとともに、LURE ペプチド-LURE 受容体複合体をさまざまな組み合わせで混合し、共結晶化を行った。その結果、単体の結晶化では MIK1、MIK2 において、複合体では AtLURE1.2/MDIS1/MIK2 複合体で結晶が得られた (図 5)。現在、複合体の結晶構造を得るために、共発現などの発現条件を含めた試料調製方法の検討を行っているところである。

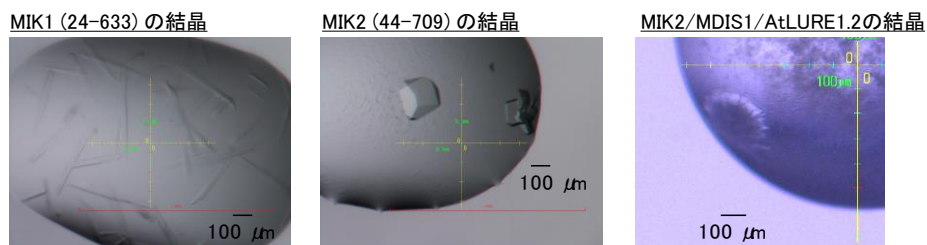


図5 結晶の写真

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu Yuqun, Miyakawa Takuya, Nosaki Shohei, Nakamura Akira, Lyu Ying, Nakamura Hidemitsu, Ohto Umeharu, Ishida Hanako, Shimizu Toshiyuki, Asami Tadao, Tanokura Masaru	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural analysis of HTL and D14 proteins reveals the basis for ligand selectivity in Striga	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41467-018-06452-2	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 -

1. 著者名 Ishida Hanako, Ohto Umeharu, Shibata Takuma, Miyake Kensuke, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 592
2. 論文標題 Structural basis for species specific activation of mouse Toll like receptor 9	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2636 ~ 2646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13176	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 -

1. 著者名 Ohto Umeharu, Ishida Hanako, Shibata Takuma, Sato Ryota, Miyake Kensuke, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 649 ~ 658.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.03.013	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田英子、大戸梅治、柴田琢磨、佐藤亮太、三宅健介、清水敏之
2. 発表標題 自然免疫受容体TLR9活性化機構の構造生物学的研究
3. 学会等名 平成30年度日本結晶学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----