

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892004

研究課題名(和文) In planta発現系を用いた定量的SRK-SCR相互作用解析系の構築

研究課題名(英文) Construction of experimental method for SRK-SCR interaction by using an SRK protein from plant cells.

研究代表者

山本 雅也 (Yamamoto, Masaya)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70732543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物の半数は、自己の花粉との受精を防ぐため自家不和合性とよばれる機構をもち、受容体であるSRKとリガンドであるSCRにより成り立っていることが知られている。しかし、SRK-SCR相互作用の分子機構の詳細は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではSRK-SCR相互作用解析の構築を目指した。本研究では、SRKとSCRタンパク質の調製法を構築できた。また調製したSCRを用いることで、これまで明らかになっていなかった興味深い認識特異性をもつSCRタンパク質が単離できた。今後、本研究で構築した実験系を用いることで、より詳細はSRK-SCR相互作用の分子機構を明らかにできると期待される。

研究成果の概要(英文)：The Brassicaceae plants possess the self-incompatible mechanism to avoid a self-fertilization. SRK, which is a receptor kinase in the stigma cell, and SCR, which is a pollen coat-localized ligand, play a major role in self-incompatible response. Although SRK-SCR interaction is important for self-incompatibility, its molecular mechanism remains unclear. Therefore, I made to construct the experimental method for analysis of SRK-SCR interaction. For this purpose, I developed preparation methods for SRK protein from *A. thaliana* cells and SCR protein from *E. coli* cells. By using SCR protein, we analyzed a BoSCR-45, and found an interested property. I would like to investigate the molecular mechanism of SRK-SCR interaction by using developed method in this work.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：自家不和合性 アブラナ科植物 分子細胞生物学 ペプチド-リガンド相互作用

1. 研究開始当初の背景

約半数の植物は自己の花粉との受精を防ぎ、他の個体の花粉と受精する他殖性である。他殖を行うことで、近交弱勢を回避するとともに、集団内の遺伝的多様性を維持することができる。他殖性のアブラナ科植物では、自己の花粉を柱頭で認識して自己の花粉発芽および花粉管伸長を防ぐ自家不和合性機構をもつ (Fig. 1)。アブラナ科植物の自家不和合性は、*S-locus receptor kinase* (*SRK*) と *S-locus cysteine rich protein* (*SCR*) が中心的な役割を果たしている。SRK は柱頭の乳頭細胞の細胞膜に局在する受容体キナーゼであり、SCR は花粉表面に存在するペプチドリガンドである。SRK 遺伝子と SCR 遺伝子はゲノム上の近接した領域に座上しており、次世代に一つのユニットとして遺伝する。このユニットを *S* ハプロタイプとよぶ。SRK と SCR は、多くの対立遺伝子をもつため (同一種内でも 50-100 の対立遺伝子が存在する)、多くの *S* ハプロタイプが存在する。SRK は同一の *S* ハプロタイプ由来の SCR と相互作用することで、自家不和合性反応を引き起こす。そのため、SRK と SCR の *S* ハプロタイプ特異的相互作用は自家不和合性反応において、最も重要なステップの一つである。

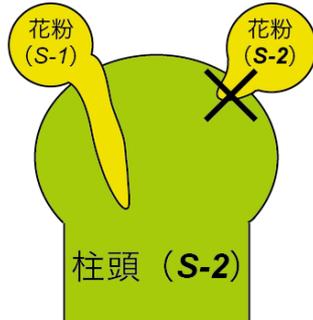


Fig. 1 アブラナ科植物の自家不和合性機構 ハプロタイプ S-2 の柱頭はハプロタイプ S-2 の花粉を特異的に認識し花粉管の出芽、伸長を阻害する。一方、他の *S* ハプロタイプの花粉は伸長する。

研究代表者の所属する研究室では、アブラナ科植物である *Brassica rapa* と *Brassica oleracea* の多くの *S* ハプロタイプを収集するとともに、その塩基配列を解析している。その結果、*Brassica rapa* と *Brassica oleracea* 間で高度に保存されている *S* ハプロタイプが存在することを見いだした。このような *S* ハプロタイプのペアのことを種間ペアとよぶ。種間ペアの *S* ハプロタイプに関して、*B. rapa* と *B. oleracea* の種間ハイブリッドを用いた交配実験から、*S* ハプロタイプの塩基配列は極めて似ているが、認識特異性は異なっている種間ペアが見いだされている。

また、研究開始時点で研究代表者は、シロ

イヌナズナ葉肉プロトプラストから、自己リン酸化能力をもつ SRK タンパク質を単離することができていた。

2. 研究の目的

SRK-SCR 相互作用の分子機構が明らかになっていない理由の一つとして、定量的に SRK-SCR 相互作用を解析する実験系が構築されていないことが挙げられる。特に本研究では、未破碎のインタクトな細胞上で SRK と SCR の相互作用を解析できる実験系を目指した。そこで本研究では、シロイヌナズナ葉肉プロトプラストで発現させた SRK を用いて、定量的に SRK-SCR 相互作用を解析できる実験系の構築を目指した。また、SRK-SCR 相互作用の強さを定量的に解析することも計画した。

3. 研究の方法

SRK-SCR 相互作用をインタクトな細胞上で定量的に解析するため、シロイヌナズナ葉肉細胞由来のプロトプラストを用いることにした。本研究では、まず既に自己リン酸化能力を有する SRK が調製できていた一過的発現系で発現した SRK の解析を行った。続いて、恒常的にシロイヌナズナで SRK を発現する株を作製した。作製した形質転換シロイヌナズナから調製した SRK の解析を解析し、SRK 調製法の構築を目指した。

一方、SCR の調製法としては、大量に調製する必要があるため、大腸菌を用いて調製することにした。大腸菌から調製した SCR が機能するか、植物体を用いたバイオアッセイ法により検討を行った。

また、SRK と SCR の *S* ハプロタイプ特異的相互作用の分子機構を明らかにするために必要な *B. rapa* や *B. oleracea* の *S* ハプロタイプの探索を行った。

4. 研究成果

SRK の発現系を構築するため、シロイヌナズナで機能することが知られているシロイヌナズナ近縁種である *Arabidopsis lyrata* の SRKb (*Sb* ハプロタイプ) を用いることにした。まず、既に自己リン酸化能力をもつ SRKb の調製法が確立していたシロイヌナズナ葉肉プロトプラストを用いた一過的発現系を検討した。シロイヌナズナ葉肉プロトプラストに PEG 法により 35S プロモータで SRKb を発現する遺伝子を導入して、一晚培養した後、SRKb を回収した。SRK-SCR 相互作用を解析するには SRK が細胞膜表面に局在する必要

がある。そこで、N 結合型糖鎖の切断酵素である endoglycosidase H (Endo H) を用いて検討を行った。SRK が機能する場である柱頭の乳頭細胞では合成された SRKb のうち約半分が細胞膜表面へと輸送される (Yamamoto et al. 2014 発表論文 1)。しかし、シロイヌナズナ葉肉プロトプラストで一過的に発現させた SRKb は全く細胞膜へと輸送されていなかった (Fig. 2)。

私は、シロイヌナズナ葉肉プロトプラストで一過的に発現させた SRKb が細胞膜に輸送されていなかったのは、PEG 法を用いたためではないかと考え、恒常的に SRKb を発現している形質転換シロイヌナズナを作製することにした。35S プロモータで SRKb を発現するための遺伝子をアグロバクテリウムを介して、シロイヌナズナに導入した。得られた T₁ 植物のロゼッタ葉からタンパク質を回収して、ウエスタンブロットを行った。発現量が十分な形質転換体を選抜した。選抜した形質転換体から葉肉プロトプラストを調製した後、タンパク質画分を回収した。Endo H を用いて、SRKb が細胞膜に輸送されているか検討を行ったところ、合成された SRKb の一部は細胞膜へと輸送されていることが示された (Fig. 2)。結果、SRK-SCR 相互作用を解析するための SRKb の発現系が構築できた。一方で、葉肉プロトプラストにおける細胞膜に輸送されている SRKb の割合は、シロイヌナズナ乳頭細胞の割合 (約 50%) より少なかったため (Fig. 2)、今後、さらなる発現系の改良が必要である。

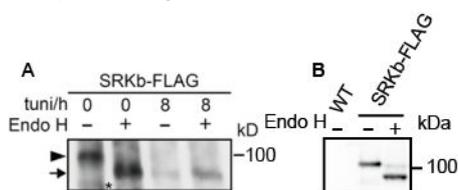


Fig. 2 シロイヌナズナ葉肉プロトプラストで発現した SRKb の細胞内局在解析 シロイヌナズナ葉肉プロトプラストで一過的に発現した SRKb (A) および SRKb を恒常的に発現しているシロイヌナズナ葉肉プロトプラスト (B) における SRKb の細胞内局在を Endo H 処理およびウエスタンブロットで解析した。A では全ての分子種が Endo H 感受性である。一方、B では一部の SRKb は Endo H 耐性の分子種である。図 A は Yamamoto et al. 2014 (発表論文 1) の Fig. 3B を改変した。

SCRb の調製は大腸菌を用いて行った。シグナルペプチドを除いた SCRb に His₆ タグを付加し、大腸菌で発現して封入体として回収した。グアニジン塩酸塩で可溶化した後に refolding を行った。その後、Ni-NTA で精製した。His₆ タグを切断した後に、脱塩および濃縮し SCRb タンパク質を調製した。調製した SCRb タンパク質を SRKb を発現するシロイヌナズナ柱頭に塗布した後、シロイヌナズ

ナ野生株の花粉を交配して、花粉発芽および花粉管の伸長を観察した。結果、SCRb を処理することで、野生株の花粉発芽および花粉管伸長は顕著に阻害されていた。結果、機能を有する SCRb が調製できた。

また、*B. rapa* や *B. oleracea* の SCR タンパク質に関しても、SCRb と同様の調製法で調製し、活性を有する SCR タンパク質が得られた。調製した SCR タンパク質を用いて解析を行った結果、*B. oleracea* S-45 に関して、種間ペアであるが認識特異性は異なっている *B. rapa* の S ハプロタイプが同定できた。この種間ペアは SRK-SCR 相互作用の認識特異性の分子機構を解析するための良い材料となると期待される。

本研究では、*in planta* で SRK-SCR 相互作用を解析するための実験系の構築を目指した。本研究を行っている期間中に研究代表者は、SRKb の機能発現に N 結合型糖鎖修飾が必要なことを見いだした。この結果は、SRK と SCR の相互作用を解析するためには、真核生物を用いた発現系が重要なことを示唆している。そのため、シロイヌナズナ植物体を用いた SRK 発現系の構築は今後の自家不和合性研究に役立つと期待される。また、SCR の調製法が確立できた。実際に確立した SCR 調製法を用いることで、これまで認識特異性が同じか異なっているか明らかになっていなかった種間ペアの認識特異性を明らかにすることができた。今後、蛍光基質等でラベル化した SCR を用いることで、SRK-SCR 相互作用の解析が行えると期待される。これにより、アブラナ科植物の自家不和合性の認識特異性の分子機構の詳細を明らかにしたい。

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 3 件)

(1) Yamamoto M., Tantikanjana T., Nishio T., Nasrallah M.E., and Nasrallah J.B. Site-Specific N-glycosylation of the S-Locus Receptor kinase and Its Role in the Self-Incompatibility Response of the Brassicaceae., (2014) *Plant Cell*, 査読あり, **26**, 4749-4762. DOI: 10.1105/tpc.114.131987.

(2) Yamamoto M., and Nishio T. Commonalities and differences between Brassica and Arabidopsis self-incompatibility., (2014) *Horticulture Research*, 査読あり, **1**,

14054-14054. DOI: 10.1038/hortres.2014.54.

(3)Maruyama D., Yamamoto M., Endo T., and Nishikawa, S., Different Sets of ER-Resident J-proteins Regulate Distinct Polar Nuclear-Membrane Fusion Events in Arabidopsis thaliana., (2014) *Plant Cell Physiol.*, 査読あり, 55, 1937-1944. DOI: 10.1093/pcp/pcu120.

〔学会発表〕(計5件)

(1) 山本雅也, 西尾剛, Nasrallah J.B., Self-incompatibility signaling starts from the plasma membrane in the Brassicaceae. 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18日-2016年3月18日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

(2)吉田郁也, 山本雅也, 北柴大泰, 西尾剛, Brassica oleracea S-45 の特性解析, 第10回東北育種研究会, 2015年11月14日-2015年11月14日, 東北大学雨宮キャンパス(宮城県仙台市)

(3) 山本雅也, Tantikanjana T., 西尾剛, Nasrallah M.E., and Nasrallah J.B. The role of N-glycosylation of SRK in the self-incompatibility response of the Brassicaceae, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16日-2015年3月16日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

(4) 山本雅也, Nasrallah, J.B., Study of self-incompatibile SRKb-SCRb transformed *A. thaliana* unravel the roles of site-specific N-glycosylation of the S-locus receptor kinase on self-incompatible response., The 38th NAITO CONFERENCE on Molecule-based biological systems., 2014年10月7日-2014年10月10日, シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市)

(5) 山本雅也, Nasrallah, J.B., アブラナ科植物の自家不和合性におけるSRKbのN結合型糖鎖修飾の役割の解析, 日本育種学会 第126回講演会, 2014年9月26日-2014年9月27日, 南九州大学(宮崎県都城市)

〔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
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者
山本 雅也 (YAMAMOTO, Masaya)
東北大学大学院・農学研究科・助教
研究者番号: 70732543

(2)研究分担者
なし
研究者番号:

(3)連携研究者
なし
研究者番号: