公開

研 究 終 了 報 告 書

「 植物の自家不和合性における細胞間相互作用のダイナミクス 」

研究期間:2020 年 10 月～2024 年 3 月
研 究 者: 村瀬 浩司

1. 研究のねらい

被子植物の多くは種の遺伝的多様性を保つために、自己の花粉を拒絶して、非自己の花粉で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 *S* と呼ばれる 1 遺伝子座の多数のハプロタイプにより調節されており、雌ずい(めしべ)と花粉がもつハプロタイプが一致すると花粉の拒絶が起こる。この雌ずいと花粉の細胞間相互作用における自他識別反応は *S* 遺伝子座にコードされている *SRK* と *SP11* 遺伝子によって支配されており、雌ずいで発現する受容体キナーゼ SRK は花粉から放出されるリガンドの SP11 をハプロタイプ特異的に認識して花粉拒絶反応を誘導する。これまでに S_8 および S_9 ハプロタイプについて SRK-SP11 複合体の結晶構造が決定され、SRK によるハプロタイプ特異的な SP11 認識機構のメカニズムを明らかにしてきた。アブラナ科の *S* ハプロタイプは元々1つから始まり、現在の多数のハプロタイプに進化したと考えられているが、どのようにして新しいハプロタイプが誕生するのか、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、本研究では MD シミュレーションやゲノムシーケンスの技術を用いて、ハプロタイプ新生のメカニズム解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

アブラナ科の自家不和合性におけるハプロタイプ新生時には SRK-SP11 間での認識変化および *S* 遺伝子座のゲノム構造変化による *SRK-SP11* 間の相同組み換え抑制が起こると考えられている。本研究ではまず、近縁な 3 組のハプロタイプから予測した SRK と SP11 の祖先種について立体構造をモデリングして MD シミュレーションを行い、MM-GBSA 法にて結合自由エネルギーを求めたところ、いずれの推定祖先種も自己の組み合わせで強い相互作用が観察された。次に FoldX ソフトウエアを用いて 2 つのハプロタイプおよびその推定祖先種 S_A 間でアミノ酸配列が異なる残基について、ハプロタイプの移行に必要なアミノ酸残基を予測したところ、各ハプロタイプ共に SRK, SP11 でそれぞれ 1~2 アミノ酸の変異で十分であることが明らかになった。S_A から現存種への移行に必要な 3 アミノ酸残基はいずれの変異でも SRK-SP11 相互作用が弱くなり、ハプロタイプ新生過程では自家不和合性が大きく減弱する可能性が示唆された。また、現存種の SRK は SP11 結合ポケットを狭くすることによって S_A-SP11 を拒絶していること、現存種の SP11 は狭くなったポケットに結合できるよう変化したことも明らかになった。

これまでに解析された *S* 遺伝子座におけるゲノム構造の多様性から、ゲノム構造の変化がハプロタイプ新生に関わっていると予想されていたが、それらのゲノム構造の変化がハプロタイプ誕生に貢献したのか、もしくはハプロタイプ新生後に偶然起こったのかは不明であった。そこで本研究では新たに 40 のハプロタイプについてナノポアシーケンスを行って *S* 遺伝子座の配列を決定し、配列決定済みの 8 ハプロタイプを合わせて解析したところ、約半数のハプロタイプに

て *SRK* か *SP11* に逆位もしくは転移のゲノム構造変化が観察された。同じ *S* 遺伝子座にコードされている *SLG* や *SMI* にはこのようなゲノム構造変化は観察されなかったため、これらのゲノム構造変化は偶然に起こったものではなく、ハプロタイプ新生に有利に働いたので残ったと考えられる。MD シミュレーションで解析したハプロタイプ間では *SRK* に逆位が起きており、このゲノム構造変化がハプロタイプ間の相同組み換え抑制に機能したと思われる。本研究はハプロタイプ新生に必要な変異を同定した初めての例であり、ハプロタイプ新生のメカニズムおよび自家不和合性進化の理解に貢献すると期待される。

（2）詳細

1. MD シミュレーションによる自他識別変化の解析

アブラナ科植物の自家不和合性において、ハプロタイプ新生時に自家不和合性が維持されたまま変化しうるのかを検証するために、MD シミュレーションを用いて SRK-SP11 相互作用を解析した。まず、アブラナ（*Brassica rapa*）の近縁なハプロタイプ 3 組について SRK と SP11 の祖先配列を GRASP ソフトウエアで予測した。祖先配列を正しく予測できていれば、推定祖先種の SRK と SP11 は自己のペアと強く相互作用するはずであるため、これを MD シミュレーションにて検証した。3 つの推定祖先種（S_A, S_B, S_C）について、MODELLER を用いて SRK-SP11 複合体の立体構造をモデリングし、Amber を用いて 100 ns の MD シミュレーションを行った。MM-GBSA 法により各複合体の結合自由エネルギーを測定したところ、いずれの推定祖先種も自己の組み合わせで強い相互作用を示す結果になった。推定祖先種と現存種の組み合わせで行った場合は基本的に結合が不安定になったが、一部は推定祖先種に対して比較的高い親和性を示し、推定祖先種の性質をある程度引き継いでいると予想された。

次に推定祖先種 S_A から現存種に移行するのに必要なアミノ酸残基を特定するために、FoldX ソフトウエアを用いて SRK-SP11 複合体が不安定化するアミノ酸残基を解析したところ、推定祖先種 S_A から現存種への変化にはそれぞれ SRK、SP11 ともに 1~2 アミノ酸で十分であることが予想された。S_A の SP11 と SRK にこれらのアミノ酸残基を現存種型に変化させると、それぞれ現存種の SRK もしくは SP11 と強い相互作用を示すことが MD シミュレーションでも確認された。S_A から現存種への移行時に自家不和合性の形質が変化するかを確認するために、S_A-SRK-S_A-SP11 複合体にそれぞれのアミノ酸を現存種型に変化させて MD シミュレーションを行ったところ、いずれの変異でも相互作用が大きく減弱した。データにばらつきがあるため、より詳細な解析を行う必要があるが、MD シミュレーションの結果は S_A から現存種への移行にはどの進化経路を経ても自家不和合性が失われる可能性を予測した。

2. *in planta* における自家不和合性解析系の確立

モデル植物であるシロイヌナズナに近縁種 *Arabidopsis lyrata* の *SRK* と *SP11* を導入すると自家不和合性になることが知られており、最近、アブラナ *SRK* の細胞外ドメインと *A. lyrata* の *SRK* 細胞内キナーゼドメインを融合させると自家不和合性になると報告があったため、MD シミュレーションに用いている 6 種のハプロタイプについて同様に *SRK* 融合遺伝子と *SP11* 遺伝子をシロイヌナズナに導入した。それぞれ 3-5 株について自家不和合性の形質を調べたところ、1つ

のハプロタイプのみ自家不和合性が観察された。そこで、該当のハプロタイプの推定祖先種である S_B-*SRK, SP11* 遺伝子について、同様にシロイヌナズナに導入したところ、S_B-*SRK, SP11* 導入株でも種子の減少が観察され、自家不和合性が導入されたことが確認できた。これらの結果により、S_B から現存種への移行については *in planta* での検証が可能になった。

3. 相同組み換え検出系の開発

ハプロタイプ新生時に *SRK-SP11* 間で相同組み換えが起こると自家不和合性が維持できなくなるため、*SRK-SP11* 間で相同組み換えが抑制されるゲノムの構造変化が起こる。*S* 遺伝子座のゲノム構造変化が相同組み換え頻度に及ぼす影響を評価するために、相同組み換え依存的に種子が GFP を蓄積する相同組み換え検出系の構築を試みた。まず、シロイヌナズナに *Cas9* および相同組み換えを起こすためのカセットで挟んだルシフェラーゼ遺伝子を導入した形質転換体を作製した。次に、得られた個体にガイド RNA と組み換えカセットに挟まれた *OLE1-GFP* とその N 末端もしくは C 末端に終止コドンを入れた（m1, m2）3つのコンストラクトを導入した。得られた種子から *OLE1-GFP* が導入された個体を選抜して、該当の領域に *OLE1-GFP* が組み込まれたかを確認したところ、*OLE1-GFP* と m2 についてそれぞれ 1 個体ずつ目的の個体が得られた。計 60 個体を選抜してジーンターゲッティングが起きた確率は 3.3% であり、より確立を上げる必要があると判断された。

OLE1-GFP の 2 つの終止コドン間の距離が近いと組み換え頻度が低くなるため、*GFP* に人工イントロンを入れて終止コドン間の距離を広げるコンストラクトを作製した。まず、S_8-*SP11* にある 4 kb のイントロンを試したが、機能しなかったので、同じシロイヌナズナのイントロン（At1G02400, 1.5 kb）を *GFP* の 4 か所にそれぞれ入れたコンストラクトを用いて試したところ、3 つのコンストラクトで種子に GFP 蛍光が観察できた。今後はこれらのコンストラクトについて、*GFP* に終止コドンを入れたものを作製して植物の導入する必要がある。

4. *S* 遺伝子座の解析

これまでに *B. rapa* では 8 つのハプロタイプについて *S* 遺伝子座の配列が決定されており、*S* 遺伝子座の構造多様性からゲノム構造の変化がハプロタイプ新生に貢献したと推測されているが、これらのゲノム構造変化がハプロタイプ新生に関わったのか、もしくはハプロタイプ誕生後に偶然起きたのかは不明であった。そこで、本研究ではゲノム構造変化とハプロタイプ新生の関係を解明するために、網羅的な *S* 遺伝子座の解析を行った。これまでに山形県小国町やトルコの自然集団からハプロタイプが収集されているが、実際に自然集団にいくつのハプロタイプがあるのかは不明であった。そこで利根川流域で発見した大きな自然集団から種子を収集して、484 個体について 5 つのバッチに分けてゲノムの抽出を行い、*SRK* の細胞外領域について PCR で増幅してハプロタイプを決定した。合計で 698 のハプロタイプを決定し、262 のハプロタイプはデータベースに未登録のものであった。最終的にそれらのハプロタイプは 16 種類に分類された。1～3のバッチでは未発見のハプロタイプが検出されたが、バッチ 4, 5 では未同定のハプロタイプは得られなかったため、ハプロタイプが飽和するまで調査できたと判断した。利根川の自然集団から得られたハプロタイプは 45 種類あり、小国の自然集団から収集された 21 のハプロタイプをすべて含んでいたため、日本の自然集団にあるハプロタイプはおおむね収集できたと思われる。一方、トルコ系統の 16 ハプロタイプとは 11 種類共通しており、世界に

はまだ未同定のハプロタイプが残っていることが示唆された。

利根川の集団から得られたハプロタイプは自殖してホモ化した後、すでに *S* 遺伝子座の配列が決定されたハプロタイプを除いてゲノムを抽出し、ナノポアシーケンスにより *S* 遺伝子座の配列を決定した。トルコ系統も併せた計 50 のハプロタイプのうち、48 ハプロタイプの *S* 遺伝子座についてその配列が明らかになった。SRK の細胞外領域を元に作製した系統樹と *S* 遺伝子座の比較から、ゲノム構造の変化が起きたハプロタイプの分岐点を調べたところ、*SRK* もしくは *SP11* 遺伝子の逆位は 29.8%、転移は 12.7%の頻度で起きていることが明らかになった。一方、同じ *S* 遺伝子座の遺伝子である *SLG* では逆位のみが 1 回起きており（2.1%）、*SMI* では両構造変化は起きていなかった。これらの結果は *SRK* もしくは *SP11* 遺伝子に逆位や転移などのゲノム構造変化が起きることがハプロタイプ新生に寄与したことを示唆している。

次に MD シミュレーションで解析した S_A ハプロタイプの現存種を比較をしたところ、*SRK* の逆位が観察された。また、*SP11* 遺伝子の重複も検出されたが、その第 1 エクソンは欠損していた。重複した *SP11* の第 2 エクソンは元の配列とほぼ同じであり、ごく最近起こったものと判断されたため、ハプロタイプ誕生には関わっていないと予測された。本研究の一連の結果から、推定祖先種 S_A から現存種に移行する過程で起こった主要な変異を同定することができたと考えられる。

5. その他

1. 露崎研究者との共同研究により、情報科学的アプローチによる SRK 様受容体・リガンドペア予測技術の開発を行った。
2. 石研究者との共同研究により、シロイヌナズナの木部で発現する CLE ペプチドホルモン受容体の探索を行った。

3. 今後の展開

アブラナ科植物の自家不和合性はアブラナ科の祖先で誕生した原初のハプロタイプから現在の多数のハプロタイプへと進化した。この自家不和合性成立の過程を解明することは自家不和合性分野における主要な課題の 1 つである。本研究では 1 つのハプロタイプペアを用いてハプロタイプ新生における変化の過程を初めて解明し、自家不和合性進化の理解に一歩前進した。本研究で用いた MD シミュレーション等の情報科学的技術や網羅的な *S* 遺伝子座配列の整備は今後のハプロタイプ新生と進化の研究に役立つと期待される。

また、現在販売されているアブラナ科根菜類の多くは雑種強勢を利用した F_1 ハイブリッド品種であり、F_1 種子の作製には自家不和合性の性質が利用されている。育種の過程ではハプロタイプのチェックが必要であるが、*S* 遺伝子座はハプロタイプによって独自の配列をもっているため、効率的なハプロタイプ同定法の確立が望まれている。本研究では 16 種類の新規ハプロタイプを同定し、40 ハプロタイプの *S* 遺伝子座配列を決定した。これらの配列情報は今後の育種マーカーや新しい品種の開発に貢献することが期待される。

4. 自己評価

本研究ではハプロタイプ新生時に起きたイベントを一つのハプロタイプペアで明らかにできたこと、新しいハプロタイプの収集と *S* 遺伝子座配列の決定で自家不和合性研究の基盤整備ができ

たことで、一定の進展があったと評価している。今後これらのデータをまとめて公開していきたい。一方、相同組み換え検出系の確立では人工イントロンが機能しないトラブルなどがあり、当初の計画より遅れているため、今後の課題である。*S*遺伝子座配列の解析から同じハプロタイプで片方にトランスポゾンが入ったバリアントが得られており、代替のツールとして活用できるものも得られている。

5. 主な研究成果リスト

(1)代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 村瀬浩司、高山誠司:アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別機構の構造生物学。生物物理、61, 321-323 (2021)。