

様 式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 27 年度）

1. 機関番号 

|   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 6 | 0 | 3 |
|---|---|---|---|---|

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 若手研究(B) 4. 補助事業期間 平成 27 年度 ~ 平成 28 年度

5. 課題番号 

|   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | K | 1 | 8 | 6 | 8 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|

6. 研究課題名 構造から迫るアブラナ科植物の自家不和合性機構

## 7. 研究代表者

| 研究者番号           | 研究代表者名           | 所属部局名       | 職名 |
|-----------------|------------------|-------------|----|
| 5 0 4 6 7 6 9 3 | ムラセ コウジ<br>村瀬 浩司 | バイオサイエンス研究科 | 助教 |

## 8. 研究分担者

| 研究者番号 | 研究分担者名 | 所属研究機関名・部局名 | 職名 |
|-------|--------|-------------|----|
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |

## 9. 研究実績の概要

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Sと呼ばれる一遺伝子座の複対立遺伝子によって支配され、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。アブラナ科のS決定因子はすでに同定され、雌しべに存在する受容体キナーゼSRKと花粉に存在するリガンドSP11のS特異的な相互作用により自他識別が行なわれているが、その特異性を決めるメカニズムは不明である。そこで本研究ではS決定因子およびその複合体についてX線結晶構造解析による自他認識とシグナル伝達メカニズムの解明を目的とする。

本年度はSRKの細胞外領域についてタンパク質の大量発現を行った。SRKはバキュロウイルスを用いた昆虫細胞の発現系を用いて培地中に分泌させた。培養上清を限外ろ過によって濃縮し、FLAGヒーズによるアフィニティー精製、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによって単一のバンドに精製した。250 Lの培養上清から約5 mgのSRKタンパク質を得ることができ、収率は30~40.61549;g/Lであった。得られたバンドはプロテインシーケンスを行ってSRKタンパク質であることを確認した。SRKタンパク質の分子量をMALDI-TOF-MS解析により測定したところ、計算分子量よりも約2,200 Daほど大きい値を示し、糖鎖修飾を受けていると考えられた。SRKについて384条件で結晶化スクリーニングを行ったところ、1条件で棒状の結晶が得られた。再現を試みたが、結晶の成長性が悪く、単体の結晶化は難しいと判断された。次にSRKとSP11を混合して同様に結晶化スクリーニングを行ったところ、22条件でダイヤモンド型もしくは棒状の結晶が得られた。今後はこれらの結晶について解析を進めていく予定である。

## 10. キーワード

|               |     |     |     |
|---------------|-----|-----|-----|
| (1) タンパク質構造解析 | (2) | (3) | (4) |
| (5)           | (6) | (7) | (8) |

## 11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度は目標であったSRKの大量発現と結晶化スクリーニングを行い、タンパク質結晶を得ることに成功できた。この成果により、本研究のゴールに大きく前進した。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後は本年度得られたタンパク質結晶化条件を精密化して、X線回折データを得られる大きさの結晶を作製する。目的のサイズの結晶が得られたら高輝度放射光施設SPring-8にて回折データを収集する。また、セレノメチオニン誘導体を作製して、多波長異常分散法もしくは短波長異常分散法にて位相決定を試み、SRK-SP11複合体の立体構造解明を目指す予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

本研究は想定より順調に進んだため、必要とする物品費が節約できた。また、機器類の修理費用が発生しなかったため、見積もっていた費用を次年度に使用することにした。

(使用計画)

次年度はSRKのセレノメチオニン誘導体を使って結晶を作製するが、セレノメチオニンフリーの培地が高額であるため、本年度はこの培地の購入費に多くが使用されると予想される。その他は申請の予定どおり使用する予定である。

(課題番号: 15K18683)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

## 13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(0)件

| 著者名  |       | 論文標題   |         |         |      |  |
|--|-------|--|---------|---------|------|--|
| Murase, K., Sugai, Y., Hayashi, S., Suzuki, Y., Tsujii, K., Takayama, S. |       | Generation of transgenic Linum perenne by Agrobacterium-mediated transformation. |         |         |      |  |
| 雑誌名  | 査読の有無 | 巻  | 発行年     | 最初と最後の頁 | 国際共著 |  |
| Plant Biotechnology  | 有     | 32   | 2 0 1 5 | 349-352 | -    |  |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)  |       |  |         |         |      |  |
| 10.5511/plantbiotechnology.15.1109a                                      |       |  |         |         |      |  |
| 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   |       |  |         |         |      |  |

(学会発表) 計(0)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(0)件

| 発表者名 |       | 発表標題 |  |
|------|-------|------|--|
|      |       |      |  |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 |  |
|      |       |      |  |

(図書) 計(0)件

| 著者名 |  | 出版社 |       |
|-----|--|-----|-------|
|     |  |     |       |
| 書名  |  | 発行年 | 総ページ数 |
|     |  |     |       |

## 14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             |       |         |

(課題番号: 15K18683)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(3/4)

(取得) 計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             |       |         |
|          |     |     |             | 出願年月日 |         |
|          |     |     |             |       |         |

## 15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

| 国際研究集会名 | 開催年月日 | 開催場所 |
|---------|-------|------|
|         |       |      |

## 16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

## 17. 備考

|  |
|--|
|  |
|--|