

機関番号：14603

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075008

研究課題名（和文） 初期受粉過程における生殖障壁の分子解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of the genome barriers in the early reproductive process

研究代表者

高山 誠司 (TAKAYAMA SEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：70273836

研究成果の概要（和文）：アブラナ科植物の受粉-受精過程の最初の生殖障壁として機能する花粉-乳頭細胞間相互作用について解析した。その結果、花粉表層物質中には同種の乳頭細胞内のアクチン繊維の再構成を誘導し、花粉管へのCa<sup>2+</sup>を含む水の供給を促進する活性が含まれることを明らかにした。また、この和合反応経路は、自家不和合性経路により阻害されることを示すと共に、実際のCa<sup>2+</sup>輸送に関わるポンプ分子の候補を特定した。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the molecular basis for the pollen-papilla cell interactions which were thought to function as the first genome-barrier during the reproductive process in the Brassicaceae. First we found that the pollen coat contains some factor(s), which induces the rearrangement of actin filaments in the papilla cell of the same species and the secretion of Ca<sup>2+</sup>-containing water to the pollen. These compatible reactions were found to be inhibited by the self-incompatibility signaling pathway. We also identified the candidate Ca<sup>2+</sup>-transporter which were expected to function in this compatible pollination process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,700,000	0	12,700,000
2007年度	15,400,000	0	15,400,000
2008年度	15,400,000	0	15,400,000
2009年度	22,500,000	0	22,500,000
2010年度	22,500,000	0	22,500,000
総計	88,500,000	0	88,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：生殖、シグナル伝達、植物、アブラナ科、受粉、ゲノム障壁

## 1. 研究開始当初の背景

受粉から受精に至る植物の有性生殖過程では、花粉と雌ずいの細胞との間で様々な相互認識が行われ、受精に適した花粉の選別が行われている。我々は、アブラナ科植物の自家不和合性について研究を進めてきたが、そ

の過程で、花粉が乳頭細胞に受粉してから吸水・発芽に至るまでの初期受粉過程が、自家不和合性における「自己」花粉の認識・排除の場となっていることを明らかにしてきた。すなわち、花粉は自己・非自己の識別マーカとなる花粉因子 (SP11 リガンド) を保有しており、乳頭細胞の細胞膜上に存在する雌ず

い因子 (SRK受容体) が自己のSP11 リガンドと結合し活性化 (自己リン酸化) することが引き金となり、乳頭細胞内に自家不和合性反応を誘導し、自己花粉の吸水・発芽を阻害していることを明らかにしてきた。この様に、同種の「自己」の花粉が排除される仕組みは示されてきたが、一方の同種の「非自己」の花粉が、速やかに乳頭細胞上で吸水・発芽できる和合性受粉の仕組みは不明のままであった。異種の花粉が「自己」花粉と同様に吸水・発芽できないことを考えると、花粉は同種であることを示す何らかの因子 (ここでは「和合シグナル」とよぶ) を有していると推定されたが、その実体は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

アブラナ科植物の初期受粉過程が、自家不和合性の「自己」花粉認識・排除の場であるのみならず、「異種」花粉の認識・排除のいわゆる「ゲノム障壁」として機能していることを明らかにすることを目的とした。特に、同種の花粉の認識において機能していると予測される花粉上の想定分子「和合シグナル」の実体を明らかにすること、この「和合シグナル」によって誘起される乳頭細胞内の生理反応やその情報伝達系を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 「和合シグナル」モニター系の確立

花粉表層物質中に含まれる「和合シグナル」を簡易に検出するためのモニター系を確立する。和合受粉時における乳頭細胞内の生理的变化として期待されるCa<sup>2+</sup>の挙動と細胞骨格の挙動を継時的にモニターしうる系を構築する。

### (2) 「和合シグナル」の分子性状の解明

花粉より「和合シグナル」活性を回収し、上記モニター系を利用して、生化学的に分画・分析し、活性本体の分子性状を明らかにする。その分子性状を基に、「和合シグナル」分子を生化学的に同定するための手法を検討する。また、「和合シグナル」を欠失した変異株を人為突然変異体 (変異原処理、トランスポゾンタギング) の中から探索し、遺伝学的に同分子を特定することを検討する。

### (3) 「和合シグナル」の乳頭細胞内情報伝達経路の解明

「和合シグナル」により誘起される乳頭細胞内の情報伝達経路は、自家不和合性の情報伝達経路により何らかの形で阻害されることが期待される。そこで、和合受粉時と不和合受粉時の乳頭細胞内の遺伝子発現変動をマイクロアレイ等の手法により比較解析し、和合受粉時に機能する情報伝達因子を探索

する。得られた候補分子については、生化学的・分子生物学的に当該分子の機能を確認すると共に、シロイヌナズナのタグラインの解析等を通じて、和合受粉時における生理的役割を確認する。

## 4. 研究成果

### (1) 「和合シグナル」モニター系の確立

#### ①乳頭細胞におけるCa<sup>2+</sup>検出系

走査型電子顕微鏡-X線マイクロアナリシス装置を用いた解析により、受粉後、花粉直下の乳頭細胞にCaが蓄積することが示唆された。そこで、このCa変動をon timeにモニターするために、[Ca<sup>2+</sup>]センサー蛋白質であるyellow cameleon (YC) 3.6 遺伝子を乳頭細胞特異的発現プロモーターに連結したコンストラクトをシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体の乳頭細胞に花粉を受粉させて[Ca<sup>2+</sup>]変動を継時的に解析した結果、花粉の吸水、発芽、および乳頭細胞内への花粉管の侵入時に各々特徴的な細胞内[Ca<sup>2+</sup>]変動が観察された。しかし、その動態は複雑かつ不安定であり、簡易検出系として利用するには適していないことが判明した。

そこで次に、乳頭細胞表面に細胞非浸透性の[Ca<sup>2+</sup>]センサー色素calcium greenを塗布し、乳頭細胞外に出てくるCa<sup>2+</sup>含有水を検出する方法を確立した。本方法により、和合受粉時には乳頭細胞内からCa<sup>2+</sup>含有水が速やかに流出してくるのに対し、不和合受粉時 (自家受粉時あるいは異種花粉受粉時) にはその流出が全く起こらないことが確認された。さらに、このCa<sup>2+</sup>含有水の流出を誘導する「和合シグナル」活性は、花粉をシクロヘキサンで抽出した際に回収される花粉表層物質中に存在することが明らかとなった。さらに、自己花粉から回収した花粉表層物質中には自己のSP11 花粉因子が含まれるが、本因子が含まれると「和合シグナル」活性は完全に阻害されることも判明した。

上記手法により「和合シグナル」活性を簡易に測定することが可能となったが、活性の強さを定量的に測定することは困難であった。そこで、calcium greenを吸収させたアガロースビーズを作製し、被験試料で処理した乳頭細胞の上に載せて、ビーズの蛍光量を測定する「和合シグナル」の簡易アッセイ系を構築した。

#### ②乳頭細胞内アクチンフィラメント動態検出系

乳頭細胞内のアクチンフィラメントの配向を、ローダミン-ファロイジン染色法により観察した結果、和合受粉時には花粉直下に太いアクチンフィラメントが再編成されることが示唆された。そこで次に、アクチン結合蛋白質talinとGFPとの融合タンパク質を

乳頭細胞内に一過的に発現させ、この変化を on timeにモニターする系を構築した。その結果、和合受粉時には乳頭細胞内の花粉直下の部分に太いアクチンフィラメントが再構成される様子が再確認されると同時に、不和合受粉時（自家受粉時）には、花粉直下のアクチンフィラメントは逆に消失することが判明した。

アクチンフィラメントの配向の変化は、乳頭細胞内の細胞内小胞等の構造や挙動に影響を及ぼすものと予測された。そこで、和合および不和合受粉後の乳頭細胞内の細胞内小胞の膜構造を、超高压電子顕微鏡を用いて三次元的に解析し比較した。その結果、和合受粉後には、乳頭細胞内の環状の液胞構造が花粉直下に向けて牽引される様子が観察される一方、不和合受粉後には、環状液胞が球状に変形する様子が観察された。こうした乳頭細胞内小胞の構造変化は、和合・不和合受粉時の生理反応の差異に直結している可能性が強く示唆された。

## (2) 「和合シグナル」の分子性状の解明

### ① 「和合シグナル」の生化学的解析

花粉よりシクロヘキサンの抽出されてくる花粉表層物質に水を添加して脂溶性画分と水溶性画分に分離し、「和合シグナル」活性の挙動を上記簡易アッセイ系を用いて解析した。その結果、いずれの画分も単独では活性を示さず、両者を混合した場合のみ活性が再構成されることが判明した。さらに水溶性画分については、熱処理およびプロテアーゼ処理により活性が消失することが示され、タンパク質性の成分が活性に寄与している可能性が示唆された。

雌ずい乳頭細胞は、厚いワックス層とクチクラ層に覆われているために、タンパク質性の成分は、単独では乳頭細胞壁内へと侵入していけないことが示唆された。従って、脂溶性画分が活性に必要な理由は、タンパク質性の成分と相乗的に機能する可能性の他に、タンパク質性の活性本体の乳頭細胞内への侵入を補助している可能性が推察された。いずれにせよ、生化学的に「和合シグナル」を追求することは、必要とする活性画分が2つに分離してしまったことにより予想以上に難航した。現在、両活性成分の最適な抽出方法を再検討すると共に、大量の花粉を回収し、各々の画分を対象に活性本体の精製を継続して進めている。

### ② 「和合シグナル」の遺伝学的解析

シロイヌナズナ種子を変異原処理（EMS処理）して得たM2株およびトランスポゾンタギングラインの中から、不稔あるいは稔性の低下した変異株を多数選抜した。これらの中から、「和合シグナル」あるいはその下流の情報伝達系に異常を示すものの探索を進めた。しかし、現在までのところ「和合シグナル」

に変異を持つと思われる変異体は得られておらず、スクリーニングを継続して進めている。まだ、スクリーニングが不十分であるが、「和合シグナル」が類似活性を持つ混合物であり、機能欠失型の変異株を得るのが困難である可能性も考えられる。機能獲得型の形質転換体のスクリーニングも今後進めていく必要がある。

## (3) 「和合シグナル」の乳頭細胞内情報伝達経路の解明

### ① 「和合シグナル」下流で発現変動する乳頭細胞遺伝子の解析

まず、「和合シグナル」によりシロイヌナズナの乳頭細胞内で発現変動する遺伝子類を明らかにする目的で、受粉直後と受粉後15分の柱頭、無処理の柱頭と花粉表層物質塗布後15分の柱頭、シクロヘキサン処理（花粉表層物質除去）花粉による受粉直後と受粉後15分の柱頭よりRNAを回収し、マイクロアレイにより発現遺伝子の変動を解析した。その結果、「和合シグナル」を含むと考えている花粉表層物質により、カルシウムシグナリングに関係する遺伝子類や極性輸送に関与すると考えられる遺伝子類などが多数発現誘導されることが判明した。これら遺伝子類の中には、「和合シグナル」下流で乳頭細胞内で機能する因子の遺伝子類が含まれるものと期待される。

さらに、これら遺伝子類の発現に、自家不和合の情報伝達系が何らかの影響を与えるかどうかを検討することにした。シロイヌナズナは自家不和合性の花粉因子SP11あるいは雌ずい因子SRKを欠失した自家和合性変異株であることから、これらの遺伝子を導入することにより自家不和合性を復活させたシロイヌナズナ系統を確立した。このシロイヌナズナを自家受粉させた乳頭細胞と野生型の花粉を受粉させた乳頭細胞をマイクロダイセクション法により回収し、発現遺伝子類の差異をマイクロアレイにより解析した。その結果、両受粉処理により発現誘導される遺伝子類に大きな差はなく、自家不和合性反応自体は遺伝子発現を介さず進行している可能性が示唆された。

### ② 「和合シグナル」下流で機能する乳頭細胞内水輸送体の解明

「和合シグナル」は乳頭細胞から花粉にCa<sup>2+</sup>を含む水の供給を促進することが示された。この調節機構を明らかにするために、まず、水チャンネル分子のアクアポリンに対する阻害剤HgCl<sub>2</sub>で乳頭細胞を前処理したところ、和合性花粉受粉時および花粉表層物質処理時の水の流出が完全に抑制されることが示された。この結果は、「和合シグナル」下流で起こる乳頭細胞からの水の流出が、アクアポリン分子を介して行われていることを示唆した。そこで、この水輸送に関わるアクアポ

リン分子を特定することを目的として、上記発現解析データをもとに、乳頭細胞で高発現のPIP分子種を輸送分子候補として選抜した。これらPIP分子種は、いずれも受粉前後で発現レベルに変動がないことが示され、水の輸送調節がこれらの発現調節ではなく、何らかの発現後調節により行われていることが示唆された。さらに、関与する分子種を特定するために、乳頭細胞で高発現の複数のPIP分子種についてタグラインの表現型解析を行ったが、単一分子欠損体では、受粉過程における吸水遅延などの異常は観察されなかった。複数のPIP分子種が相補的に機能している可能性を考え、現在複数の分子種を欠失させた多重タグラインを作製し、その表現型解析を進めている。

### ③「和合シグナル」下流で機能する乳頭細胞内Ca<sup>2+</sup>輸送体の解明

乳頭細胞外へのCa<sup>2+</sup>供給に関わる輸送体を特定する目的で、上記マイクロアレイ解析データから乳頭細胞内で強く発現する輸送体候補を複数抽出した。これらの候補の中には、花粉や花粉表層物質処理後に発現誘導されるが、シクロヘキサシアン処理花粉では発現誘導されないものが含まれ、「和合シグナル」の下流で機能している輸送体であることが示唆された。また、本分子は、酵母変異株を用いた相補実験により、実際にCa<sup>2+</sup>輸送能を持つことが証明された。さらに、本分子のC末端にGFPを繋いだコンストラクトを乳頭細胞内に発現させて挙動を調べたところ、和合受粉時にのみ花粉管直下の細胞膜周辺に集積することが観察された。また、本分子のタグラインの解析を行ったところ、花粉を受粉させた際の吸水・発芽が遅延し、発芽率も低下する傾向が観察され、本分子が花粉へのCa<sup>2+</sup>供給を調節する輸送体である可能性が示唆された。

### ④和合受粉時における花粉管内Ca<sup>2+</sup>動態の解析

和合受粉時の花粉管内へのCa<sup>2+</sup>移行を確認する目的で、Ca<sup>2+</sup>センサー蛋白質YC3.6を花粉内で発現させるコンストラクトを作製し、形質転換体を得た。受粉後、花粉管内にCa<sup>2+</sup>が取り込まれ、発芽時にはすでに花粉管先端部においてCa<sup>2+</sup>の濃度勾配が形成されることが示された。また、従来*in vitro*培養花粉管先端ではCa<sup>2+</sup>オシレーションが観察され、これが花粉管の伸長に必須であると考えられてきたが、*in vivo*の状態では乳頭細胞壁内を伸長する花粉管にはオシレーションが観察されないという、通説を覆す結果を得た。花粉管内のCa<sup>2+</sup>の生理機能については、さらなる解析が必要であろう。

## 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10件)

① Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., *Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility*. Nature 466, 983-986, 2010. 査読有

② Isokawa, S., Osaka, M., Shirasawa, A., Kikuta, R., Komatsu, S., Horisaki, A., Niikura, S., Takada, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M., Novel self-compatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk-populations. Genes Genetic Systems 85, 87-96, 2010. 査読有

③ Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Staedler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K., Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. Nature 464, 1342-1346, 2010. 査読有

④ Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., and Takayama, S., Fine-tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth. Plant Physiology 150, 1-13, 2009. 査読有

⑤ Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Miwa, T., Funato, M., Entani, T., Nakayama, P., Shimosato, H., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S., Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination. Plant Physiology 144, 72-81, 2007. 査読有

⑥ Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S., Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. Plant Cell 19, 3961-3973, 2007. 査読有

⑦ Shimosato, H., Yokota, N., Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self-nonsel recognition in *Brassica* self-incompatibility. Plant Cell 19,

107-117, 2007. 査読有

[学会発表] (計 46 件)

① Takayama, S., Molecular mechanisms of self-incompatibility in the Brassicaceae. 21st ICSPR, Aug. 5, 2010, Bristol, UK.

② Takayama, S., Self-incompatibility signaling in Brassicaceae. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction. Mar. 11, 2010, Nara, Japan.

③ Takayama, S., Self-incompatibility signaling in *Brassica*. Symposium in 9th IPMB, Oct. 28, 2009, St. Louis, USA.

④ Iwano, M., Isogai, A., and Takayama, S., Fine tuning of the cytoplasmic calcium concentration is essential for pollen tube growth. 9th IPMB, Oct. 28, 2009, St. Louis, USA.

⑤ Takayama, S., Self-incompatibility system in *Brassica* and its application for  $F_1$ -hybrid breeding. KRIBB-NAIST Joint Symposium, Feb. 26, 2009, Jeongeup, Korea.

⑥ Takayama, S., Self-incompatibility signaling in *Brassica*. NAIST GCOE Int. Symposium, Nov. 14, 2008, Nara, Japan.

⑦ Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Takaoka, A., Isogai, A., and Takayama, S., Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination. 9th APMC, Nov. 4, 2008, Jeju, Korea.

[図書] (計 5 件)

① Kaothein-Nakayama, P., Isogai, A., and Takayama, S., Self-incompatibility systems in flowering plants. In “Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives” (Edited by Pua, E. C., and Davey, M. R.), Springer, Heidelberg, 2010, Vol. 1, pp. 459-485.

② Watanabe, M., Suzuki, G., and Takayama, S., Milestones identifying self-incompatibility genes in *Brassica* species—From old stories to new findings. In “Self-Incompatibility in Flowering Plants : Evolution, Diversity, and Mechanisms” (Edited by Franklin-Tong, V. E.), Springer, Heidelberg, 2008, pp. 151-172.

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/takayama/index.htm>

1

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山 誠司 (TAKAYAMA SEIJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授

研究者番号 : 70273836