

博士論文番号：1181024

アブラナ科植物における Ca^{2+} を介した
自家不和合性情報伝達経路の解析

伊藤 花菜江
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞間情報学研究室
(高山 誠司 教授)

平成 27 年 8 月 4 日提出

目次

序論	-3-
第1章 自家不和合性反応と Ca^{2+} 動態についての関連解析	
1-1 序	-8-
1-2 材料・方法	-9-
1-3 結果	-13-
1-4 考察	-27-
第2章 自家不和合性反応に関わる Ca^{2+} 輸送体の同定	
1-1 序	-30-
1-2 材料・方法	-31-
1-3 結果	-38-
1-4 考察	-59-
総括	-65-
謝辞	-67-
参考文献	-68-

序論

多くの生物は環境変化に耐え、種の絶滅を防ぐために遺伝的多様性を維持している。遺伝的多様性を維持する為の優れた機構の1つとして、有性生殖が挙げられる。異なる異種ゲノムを混ぜ合わせて種内の遺伝的多様性を獲得・維持するのが有性生殖の意義であるとするならば、近親交配は異種ゲノムの出会い・混ぜ合わせを妨げ、引いては種内の遺伝的多様性を喪失させて有性生殖本来の意義を失わせてしまう。また、自殖は相同染色体のホモ化を促進するため、有害劣性遺伝子のホモ化に起因すると考えられている、いわゆる自殖弱勢を招く結果につながる。そこで、多くの高等植物は自殖弱勢を回避するために自家不和合性という近親交配を拒絶する機構を生み出し、発達させてきた。

被子植物が有している自家不和合性とは、同種の花粉と雌ずい間において自己と非自己を認識し、自殖を回避する機構の1つである。他家由来の花粉が柱頭へと受粉した際には、花粉は吸水し、花粉管の発芽、伸長を経て受精へと至る。一方、自己由来の花粉が柱頭へと受粉した際には、花粉の吸水、花粉管の発芽、伸長のいずれかが選択的に阻害されることにより受精が回避される。

この他家・自家受粉時の反応の違いを引き起こす自他識別の分子機構は、*S*と呼ばれる一つの遺伝子座に存在する複対立遺伝子群 (*S*ハプロタイプ) を想定する事で、説明する事が出来る。各 *S*ハプロタイプは、花粉側の表現型を決定する因子 (花粉側因子) と、めしべ側の表現型を決定する因子 (雌ずい側因子) の両者をコードしており、自家受粉時の様に同一 *S*ハプロタイプに由来する両因子が出会うと何らかの自家不和合反応が誘起され、受精が拒否される (de Nattancourt, 2001)。

本論文において取り扱うアブラナ科植物は、カブやハクサイ (*Brassica rapa*)、キャベツやブロッコリー (*Brassica oleracea*) 等の重要な野菜を含んでおり、市販品種の大半は自家不和合性を利用して生産された F1 ハイブリッド品種である。そのため、古くからこれらの植物における自家不和合性の研究が進められており、その中で *B. rapa* においては 100 種類以上の *S*ハプロタイプが存在することが推定されている (Nou et al., 1993)。

アブラナ科植物の柱頭先端は、乳頭細胞と呼ばれる一層の細胞により覆われており、他家由来の花粉がここに受粉した際には、*B. oleracea* では受粉後約 20~60 分程で花粉の吸水反応が誘起される (Elleman and Dickinson, 1990)。この乳頭細胞から花粉への水の供給は、花粉と接している乳頭細胞表面に形成される

foot と呼ばれる構造を介して行われると考えられている。吸水した花粉は花粉管を発芽して、乳頭細胞内へと侵入し、乳頭細胞壁内を胚珠に向かって伸長させていく (Dickinson, 1995)。一方、自己由来の花粉を受粉した際には、自己花粉の吸水、花粉管の発芽、伸長が乳頭細胞上で阻害され受精へと至ることはない。

このようなアブラナ科植物の自家不和合性における自他識別反応にも、先に述べた雌ずい側因子と花粉側因子の *S* ハプロタイプ特異的な相互作用が関与していることが推定され、両因子の探索が行われてきた。その結果、雌ずい側因子としては乳頭細胞膜上で発現する膜貫通型受容体キナーゼ SRK (*S* receptor kinase)、花粉側因子としては花粉表層に存在する低分子タンパク質 SP11 (*S*-locus protein 11、別名 SCR: *S*-locus cysteine rich) が *S* 遺伝子座上にコードされていることが明らかにされてきた。SP11 と SRK は *S* ハプロタイプ毎に異なる多型性を有し、同一 *S* ハプロタイプに由来する SP11 と SRK が特異的に相互作用する結果、SRK の自己リン酸化が誘導されることも示されてきた。すなわち、アブラナ科植物の自他識別反応は *S* 遺伝子座上にコードされた、いわゆるリガンド-レセプター間のハプロタイプ特異的な相互作用によって制御されていることが明らかとなっている (Schopfer et al., 1999; Takayama et al., 2000; Takasaki et al., 2000)。

これら雌雄それぞれの *S* 遺伝子産物が同定された後、アブラナ科自家不和合性研究における興味は自他識別反応以降のシグナル伝達機構へと向けられ、SP11/SRK の下流で機能する因子の探索が行われてきた。

下流因子候補の一つ MLPK (*M*-locus protein kinase) は、自家和合性変異株 *B. rapa* var. *Yellow sarson* における変異遺伝子として同定された膜結合型キナーゼである (Murase et al., 2004) (Fig. 1A)。MLPK は SRK と細胞膜上で直接相互作用することで受容体複合体を構成し、自家不和合反応時の SP11 による SRK の活性化を補強する可能性が推測されている (Kakita et al., 2007a; Kakita et al., 2007b)。最近の研究により、MLPK は、*B. rapa* のトルコ系統の花粉を日本系統の雌ずいに受粉させた際に不和合性を示す一側性自家不和合性にも関与していることが示唆されている (Takada et al., 2013)。

また、第 2 の下流因子候補として、ARC1 (armadillo repeat containing 1) が、SRK を bait とした酵母 two-hybrid screening により同定されている (Gu et al., 1998) (Fig. 1A)。ARC1 のアンチセンス抑制株では、完全ではないが部分的に不和合性が打破された表現型を示すことから、ARC1 は自家不和合性を正に制御する下流因子であると考えられている (Stone et al., 1999)。ARC1 は E3 ユビキチンリガ

一ゼ活性を持つことから、SRK/MLPK 受容体複合体によってリン酸化されることで活性化し、自家受粉時に必須であるタンパク質をポリユビキチン化し、分解することによって自家不和合反応を誘起するというモデルがこれまでに提唱されている (Stone et al., 2003)。さらに、この ARC1 を bait とした酵母 two-hybrid screening によって、ARC1 の標的因子として Exo70A1 が同定されている (Samuel et al., 2009) (Fig. 1A)。Exo70A1 は、細胞内小胞輸送に関与する exocyst 複合体の構成因子として知られている。RNAi 法により *Exo70A1* の発現を抑制すると、雌しべ側において稔性が低下し、形成される種子数の減少が認められた。さらに、*Exo70A1* を柱頭において過剰発現させると、部分的ではあるが自家不和合性が打破されることから、Exo70A1 は花粉接着部位への何らかの物質小胞輸送を介して和合反応を正に制御する因子であり、ARC1 によって分解されることによって自家不和合性反応を誘起することが推察されている (Samuel et al., 2009)。しかし、ARC1 のアンチセンス体も Exo70A1 の RNAi 体も自家不和合性打破の程度が限定的であることからこれらの分子を介した経路が自家不和合情報伝達経路の主経路であるかどうかについては疑問視されている。

これまでに述べた不和合関連因子の同定には、材料として主に強い自家不和合性を持つ *Brassica* 属の植物 (*B. rapa*, *B. oleracea*, *Brassica napus*) が用いられてきた。しかし、これらの植物は植物体が大きく世代時間が長いために遺伝学的解析には適さず、また形質転換効率が著しく低く、分子生物学的解析にも不向きであった。一方、アブラナ科のモデル植物である *Arabidopsis thaliana* が、SRK あるいは *SP11* の欠落等により自家和合化した植物であることが示され (Sherman-Broyles et al 2007; Tsuchimatsu et al., 2010)、近縁の自家不和合性植物の *Arabidopsis lyrata* 由来の機能的な SRK と *SP11* の両遺伝子を特定の *A. thaliana* 系統に導入することで安定な自家不和合性を獲得することが示されて以来 (Nasrallah et al., 2004)、自家不和合性研究は新たな局面を迎えた。当研究室においても、独自に *A. lyrata* 由来の *S_b-SRK* と *S_b-SP11* 遺伝子を *A. thaliana* C24 系統に導入すると、安定な自家不和合性を獲得することを確認し (金谷、2008; 武久、2009)、この自家不和合性 *A. thaliana* を用いた情報伝達経路の解析に着手してきた。その中で特に、本株の乳頭細胞に Ca²⁺センサータンパク質である Yellow Cameleon を発現させた系を作出することにより、不和合受粉時に特異的に乳頭細胞内の Ca²⁺濃度が上昇することを発見してきている (矢加部、2009) (Fig. 1B)。Ca²⁺は様々なシグナル伝達系における重要なセカンドメッセンジャーとして機能していることが広く知られているが (Sanders et al., 1999; Berridge et al., 1999)、この不和合受粉時に観察される Ca²⁺濃度上昇が自己花粉の拒絶に直接関与して

いるかどうかについては全く不明であった。

そこで、本論文では、不和合受粉時に誘導される Ca^{2+} 濃度上昇が自家不和合性反応を引き起こしているのかどうかを明らかにすることに加え、本変化を惹起する分子実体を明確にすることを目的として以下の研究を行った。

第1章では、まず、不和合受粉時に誘起される Ca^{2+} 濃度上昇が SP11 によって直接引き起こされるかどうか、さらにはこの Ca^{2+} 濃度上昇が自己花粉を拒絶するために必要な現象であるのかどうかを明らかにするために乳頭細胞プロトプラストを用いた新たな実験系の構築を行った。この新規実験系を用いた解析により、アブラナ科植物において不和合受粉時に乳頭細胞内で見られる Ca^{2+} 濃度上昇は *S* ハプロタイプ特異的な SP11 と SRK の相互作用により直接誘起されることを明らかとした。さらに、熱膨張式レーザーマイクロインジェクション装置を用いた解析から、乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇が花粉の吸水反応を阻害することを明らかとした。

次いで第2章では、不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇を誘起する輸送体分子の実体を明らかとすることを目的とし、まず乳頭細胞プロトプラストと各種輸送体阻害剤を用いた薬理的解析を行った。この解析の結果、グルタミン酸受容体がこの Ca^{2+} 濃度上昇に関与する可能性を提示した。さらに、乳頭細胞において高発現のグルタミン酸受容体分子のナンセンス変異体を TILLING 法により取得し、その中の GLR3.7 と GLR3.5 の2分子種が、自家不和合反応時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関わるチャネル分子として機能していることを明らかとした。

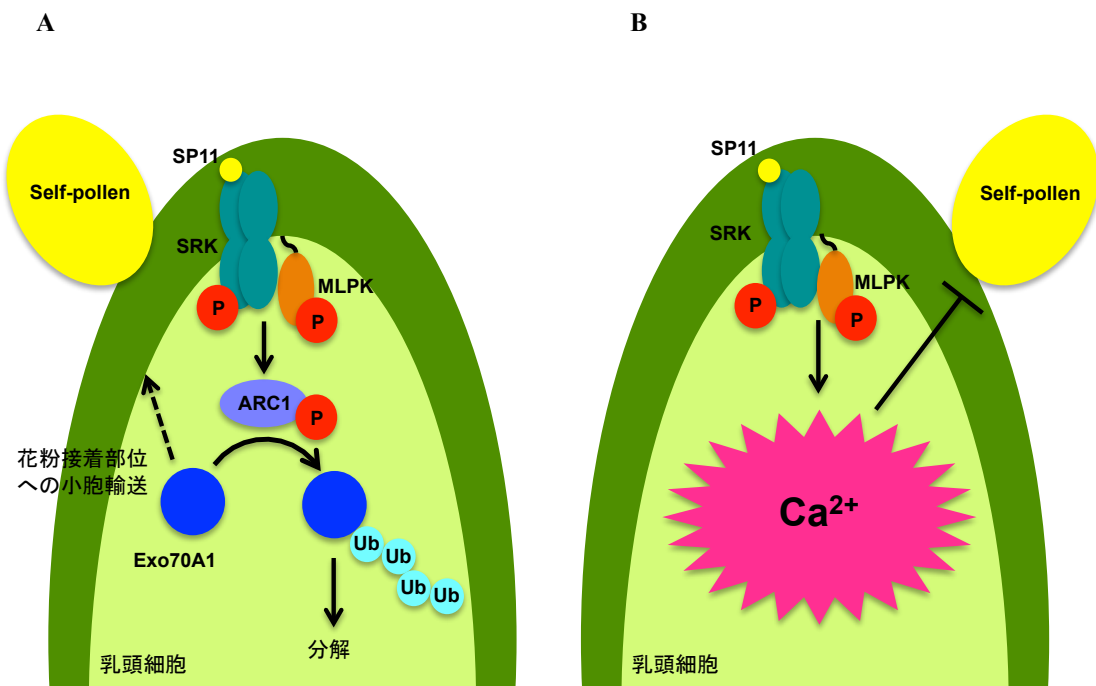


Fig. 1 アブラナ科植物自家不和合性の分子モデル図

A. ARC1 を介した自家不和合情報伝達系分子モデル図。 **B.** 乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介した新規の自家不和合情報伝達系分子モデル図。

第1章 自家不和合性反応と Ca^{2+} 動態についての関連解析

1-1 序

アブラナ科植物における不和合受粉時の乳頭細胞内では、アクチン繊維の崩壊、液胞等の細胞内小器官の構造変化、 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇などの生理変化が起きることが、これまでに報告されている (Iwano et al., 2007; 矢加部 2009)。これらの生理変化は自家受粉時特異的に生じることから、自家不和合性を引き起こすために何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆される。しかし、これら自家受粉時に誘起される生理変化が SP11 と SRK の相互作用により直接誘起されているかどうかは明らかとなっておらず、この事実を明らかにすることは困難であった。その理由として、乳頭細胞が持つ性質により不和合反応を誘起するためには花粉を受粉させることが必須であることが挙げられる。乳頭細胞は、厚いクチクラ層やワックス層に覆われており、乳頭細胞膜上の SRK へと SP11 を到達させるためには花粉を受粉させ、これらの層を分解する必要があった。そのため、実際に花粉を受粉させる実験系では、上述の乳頭細胞内生理変化が、不和合性反応である花粉の吸水・発芽阻害に至るまでの原因となる直接的变化であるのか、または、不和合性反応後に誘起される間接的变化であるのかどうかを明確にすることはできなかった。従って、この問題を解決するためには、従来手法とは異なる新たな実験系が必要であると考えられた。その新規実験系とは、乳頭細胞由来のプロトプラストを使用するというもので、もし、生理機能を保持した乳頭細胞プロトプラストを単離することに成功し、SP11 単独処理のみで上述した生理変化のいずれかを再現することができれば、これらの生理変化が SRK の下流情報伝達経路において機能する可能性を示すことができる。

そこで、本章ではまず、不和合受粉時に乳頭細胞内で見られる生理変化が、SP11 によって直接的に引き起こされるかどうかを明らかにする為に、乳頭細胞プロトプラストを用いた新たな実験系の構築を目指した。さらに、新たに構築した実験系を用いて、不和合受粉時の生理変化、特に Ca^{2+} 濃度の変動に注目し、不和合反応と細胞内 Ca^{2+} 濃度変動との関係を調べた。

1-2 材料・方法

実験材料

本研究で用いた化学薬品は特に記載のない場合、和光純薬製もしくはナカライテクス製の特級試薬、遺伝子工学用試薬は Takara 製のものを用いた。

植物材料

本研究では植物材料として、本学で栽培・維持されている自家不和合性 *B. rapa* S₈S₈ ホモ系統、S₉S₉ ホモ系統を用い、22°C、14 時間明期、10 時間暗期の条件下で栽培を行った。また、*A. thaliana* C24 系統も同様に 22°C、14 時間明期、10 時間暗期の条件下で栽培したものを用いた。形質転換体としては、*A. lyrata* 由来の S_b-SRK を発現させた *A. thaliana* C24 (金谷、2008)、Ca²⁺センサータンパク質である Yellow Cameleon 3.60 と S_b-SRK の両方を発現させた *A. thaliana* C24 (矢加部、2009) を用いた。

乳頭細胞プロトプラストの作製

開花当日の *B. rapa*、または *A. thaliana* (前日に除雄) の花を摘み取り、柱頭部分だけを取り出しスライドガラスに並べた。並べた柱頭から、メスを用いて乳頭細胞部分を切り取り、酵素液 (1.3% (w/v) cellulose Onozuka RS (Yakult), 0.0075% (w/v) pectolyase y-23 (Yakult), 0.25% (w/v) BSA, 50 mM Mes-Tris (pH5.5), 2.5 mM CaCl₂, 1 M MgCl₂, 100 mM KH₂PO₄, 0.5 M ascorbic acid, 0.55 M sorbitol) に入れて 23°C、暗下条件で 2 時間振盪させた。その後、50 × g で 5 分間遠心して上清を取り除き、プロトプラスト培地 (1 × Murashige and Skoog plant salt mixture (日本製薬), 0.1% myo-inositol, 1 × B5 vitamin (10 g/l myo-inositol, 1 g/l thiamine-HCl, 0.1 g/l nicotinic acid, 0.1 g/l pyridoxine-HCl), 10 % sucrose, 0.55 M sorbitol, pH 5.7 に調製したもの) を加えて酵素液を洗浄した。

酸化型 S_b-SP11 タンパク質の精製

S_b-SP11 は、シグナル配列を除く 27 残基目以降の成熟タンパク質部分 (Fig.

1-3A) について、不安定な N 末のグルタミン残基をピログルタミン残基に置換した形で、BioSYNTHESIS (TEXAS) に依頼して全化学合成した。合成した S_b -SP11 は、巻き戻し処理の前に dithiothreitol (DTT) (終濃度 100 mM) を加えて還元処理を行った後、C18 (ODS) カラム (218TP54, Φ 4.6 mm x 250 mm, Vydac) とアセトニトリル - 0.1% TFA 溶媒系を用いた逆相 HPLC に供して精製した。0.1% TFA で平衡化したカラムを、流速 1 ml/min でアセトニトリル濃度 16% から 40% までのグラジエント条件で精製分画した。分画後のタンパク質は凍結乾燥後、シナピン酸マトリクス (10 mg/ml sinapic acid in 0.1 % TFA, 33% アセトニトリル) 溶液と混合し、MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry) に供し、分子量を測定することにより還元型であることを確認した。次に、活性型 S_b -SP11 を得るため還元型 S_b -SP11 を 50 mM NH_4OAc (pH 7.8) によって 31 μM に溶解し、還元型グルタチオン (終濃度 0.4 mM) と酸化型グルタチオン (終濃度 0.04 mM) を 10 : 1 の割合で加え、4°C で 2 日間攪拌して酸化させた。その後、このサンプルを C18 (ODS) カラムを用いて上と同じ条件で分取した。紫外吸収ピーク (UV_{220}) 毎にタンパク質を分取し、MALDI-TOF-MS による分子量測定を行い、酸化型 S_b -SP11 の酸化状態を確認した。分子量の測定は、FlexAnalysis (Burker Daltonics) を用いてスムージングとベースラインで補正して行い、その数値を図中に表記した (Fig. 1-4)。

酸化型 S_b -SP11 の生物活性の解析 (バイオアッセイ法)

上述のように分取した酸化型 S_b -SP11 が、生物活性をもつかどうかを、 S_b -SRK タンパク質を発現させた *A. thaliana* C24 形質転換体を用いて調べた。この形質転換体と野生型の *A. thaliana* の柱頭に溶媒 (0.05% Tween20) で溶解した S_b -SP11 を一柱頭あたり約 0.1 μl 処理し、室温で 1 時間程乾燥させた。その後、柱頭に和合関係となる野生型花粉を受粉させ、室温で 3 時間置き、アニリンブルー染色により花粉管の伸長の有無を観察した (Fig. 1-5)。

乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca^{2+} イメージング

B. rapa から作製した乳頭細胞プロトプラストに、 Ca^{2+} 指示薬である Fluo4-AM (Invitrogen) を取り込ませて、細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った。まず初めに、Fluo4-AM 50 μg に DMSO (Sigma) 10 μl を加えてよく溶解した後、90 μl の 1%

Creomorph® EL (Sigma) を加え、Fluo4-AM 溶液とした。この溶液を、プロトプラストを含む培地 100 μ l に対して 1 μ l 加えた。23°C、暗下条件下で 15 分間振盪させ、培地を用いて一度洗浄を行った。その後、プロトプラストをガラスボトムディッシュ (PLL-coat ; Matsunami) の上へのせ、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 META (Carl Zeiss) のレーザー480 nm の励起波長を用いて、プロトプラスト内に Fluo4-AM が取り込まれたかどうかを確認後、化学合成品 S_8 -SP11 または S_9 -SP11 (Takayama *et al.*, 2001) を終濃度 1 nM となるように加え、プロトプラスト全体の Ca^{2+} 濃度変化を観察した。取得した画像は、256 階調の擬似カラーで表示した。

また、*A. thaliana* C24 を用いた Ca^{2+} イメージング実験には、Yellow Cameleon 3.60 と *A. lyrata* 由来の S_6 -SRK タンパク質の両方を発現させた形質転換体を用いた。この植物体から、*B. rapa* と同様の操作で乳頭細胞プロトプラストを単離した。単離した乳頭細胞プロトプラストに、終濃度 10 nM となるように化学合成品 S_6 -SP11 を処理し、プロトプラスト全体の Ca^{2+} 濃度変化を観察した。SP11 を加えた直後を 0 分とし、15 秒間隔で経時的に観察を行った。イメージングは、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss) のレーザー440 nm 励起波長を用いて CFP (465-495 nm) と YFP (515-555 nm) の 2 つの蛍光波長を検出し、それらの Ratio 値は EXCEL software を用いて EYFP/ECFP の値を算出した。さらに、それらの Ratio 画像は画像編集ソフト (ZEN, Carl Zeiss) を用いて EYFP/ECFP の画像を取得し、256 階調の擬似カラーで表示した。

レーザーマイクロインジェクション

インジェクション用の針の作製には、ガラスマイクロピペットプラーP-97/IVF (Sutter Instrument) を用いて、Heat=748、Pull=50、VEI=40、Time=250 の条件で作製した (田中、2011) 。キャピラリー内へのサンプル溶液の充填方法は、まず、インジェクトしたいそれぞれのサンプル (H_2O , 10 mM $CaCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 1000 mM KCl, 1 mM KCl) 10 μ l に対して 0.5 mM に調整した蛍光色素 Alexa 546 を 2 μ l 加えた計 12 μ l をサンプル溶液として、ここから 3 μ l を各キャピラリー内へと毛細管現象を利用して充填した。次に、マイクロローダー (Eppendorf) を用いてイオン性疎水溶液 (Nepagene) 、レーザー吸収剤 (Nepagene) の順に、それぞれ気泡が入らないように充填し、最後に紫外線硬化樹脂を充填し、紫外線を照射して硬化させた。完成したキャピラリーは、乾燥を防ぐため、モイストチャンバーに保存して使用した。乳頭細胞へとインジェ

クシオンを行う際に、乳頭細胞を固定するための Hold 用の市販の針 VacuTips (Eppendorf) を使用した。乳頭細胞内へのマイクロインジェクションには、マイクロマニピュレーター (Narishige) とレーザー熱膨張式マイクロインジェクター-LTM-1000 (Nepagene) (Okuda *et al.*, 2009) を装着した、広視野顕微鏡 Axio Observer (Carl Zeiss) を用いた。*A. thaliana* の雌ずいをカバーガラスの上に両面テープを用いて固定し、顕微鏡のステージにのせた。インジェクションを行う乳頭細胞を決め、乳頭細胞の左側を Hold 用針で動かないように固定した。次に、サンプルを充填したキャピラリーをマイクロインジェクターにセットし、乳頭細胞の右側からインジェクションを行った。インジェクションは約 0.8 のレーザー照射強度で行い、サンプルと同時にインジェクションしている Alexa Fluor 546 の蛍光強度を目視により観察し、サンプルがほぼ同程度インジェクトされるよう調整した。乳頭細胞へとサンプルがインジェクションされたことを確認した後、和合関係となる花粉をマイクロマニピュレーターにより受粉させ、花粉の吸水が起きるかどうかの観察を行った。インジェクションを行う前、直後の YC3.60 の ECFP と EYFP の蛍光強度は 2 種類の蛍光フィルター (ECFP ; 480/30, EYFP ; 535/40) により検出し、Ratio 値 (EYFP/ECFP) の計算は MetaMorph software を用いて行った。Alexa 546 のモニターには、641/75 の蛍光フィルターを用いた。

1-3 結果

乳頭細胞プロトプラストの作製

自家不和合性の情報伝達系を解明するために、本章ではまず、SP11 単独処理により自家不和合性反応を観察できるような乳頭細胞プロトプラストを用いた新たな実験系の構築を目指した。

A. thaliana あるいは *B. rapa* の乳頭細胞からプロトプラストを調製する試みはこれまで全く成されてこなかった。そこで、まず、乳頭細胞特異的に発現する AtS1 プロモーター下で Venus 標識したアクアポリン (Venus-PIP2:3) を発現させた形質転換 *A. thaliana* を作出し、Venus 蛍光を指標に乳頭細胞プロトプラストの作製条件を検討した。前日に除雄した開花当日の花から雌ずいを取り出し、メスを用いて柱頭先端の乳頭細胞部分を切り出した後に一定条件下で酵素処理を行ったところ、Venus 蛍光で細胞膜が標識された大型の乳頭細胞プロトプラストを再現性良く回収することに成功した (Fig. 1-1)。

同様の方法で、*B. rapa* の雌ずいからも乳頭細胞の作製を行ったところ、大型と小型のプロトプラストの両方が確認できたが、小型のものは乳頭細胞直下にある組織由来であると推定されたため、直径 30 μm 以上の細胞を乳頭細胞由来であると仮定して以下の実験に使用することにした (Fig. 1-2A, B)。

活性型 S_b -SP11 ペプチドの精製

当研究室では、*A. lyrata* の S_b ハプロタイプの SRK (S_b -SRK) を導入した *A. thaliana* 形質転換体を、安定な自家不和合性 *A. thaliana* として使用している。そこで、*A. thaliana* の乳頭細胞プロトプラストを使って実験を進める為には、この S_b -SRK と同ハプロタイプ由来の S_b -SP11 ペプチドを調製する必要があった。SP11 は、アミノ酸配列内に保存された 8 つのシステイン残基を持ち、これら全てが分子内ジスルフィド結合を形成し、正しく折り畳まれる事で、活性型の花粉側因子として機能する事が示されてきた (Takayama et al., 2001; 下里, 2002; Mishima et al., 2003)。そこでまず、 S_b -SP11 のシグナル配列を除く成熟ペプチド領域 (27 番目のグルタミン残基から 81 番目のシステイン残基までの領域で安定化のために N 末のグルタミンをピログルタミンに変換したもの、Fig. 1-3A) の全化学合成を依頼した。得られた合成体を、還元剤で処理した後逆相系の HPLC

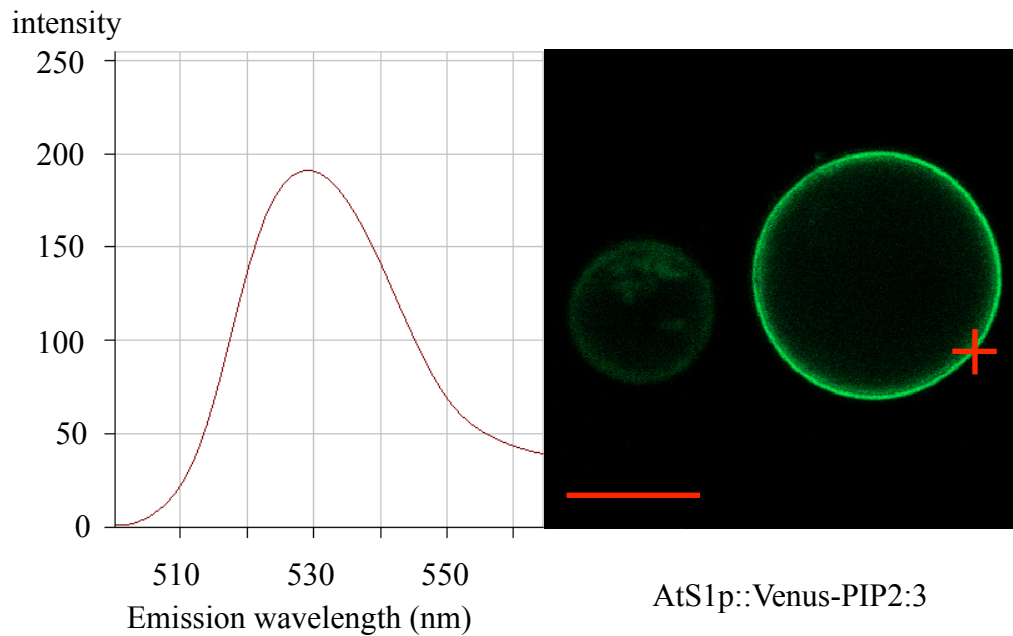


Fig. 1-1. 形質転換 *A. thaliana* 乳頭細胞から作製したプロトプラスト

Venus-PIP2:3 を乳頭細胞特異的プロモーター (AtS1p) 下で発現させた形質転換シロイヌナズナから調製した乳頭細胞プロトプラストと(+)の位置で取得した Venus の蛍光スペクトル。Scale bar: 20 μ m。Venus の励起波長は 515 nm、蛍光波長は 528 nm。

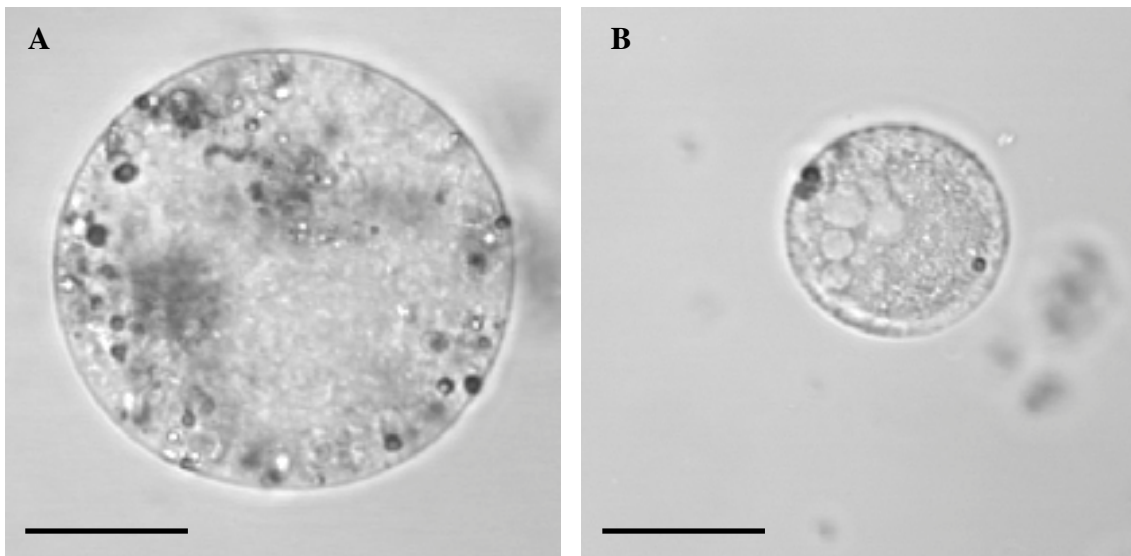


Fig. 1-2. *B. rapa* 乳頭細胞から作製したプロトプラスト

A. 乳頭細胞由来の大型プロトプラスト。B. 乳頭細胞直下の細胞由来の小型プロトプラスト。 Scale bars: 20 μm 。

A

MRNATFFIVFYVFISLVLSNVQDVTAQKNKCMRSEMFP
CGNNGEETCKKDFKNIYRTPIQCKCLDKYDFARLDCRFC

B

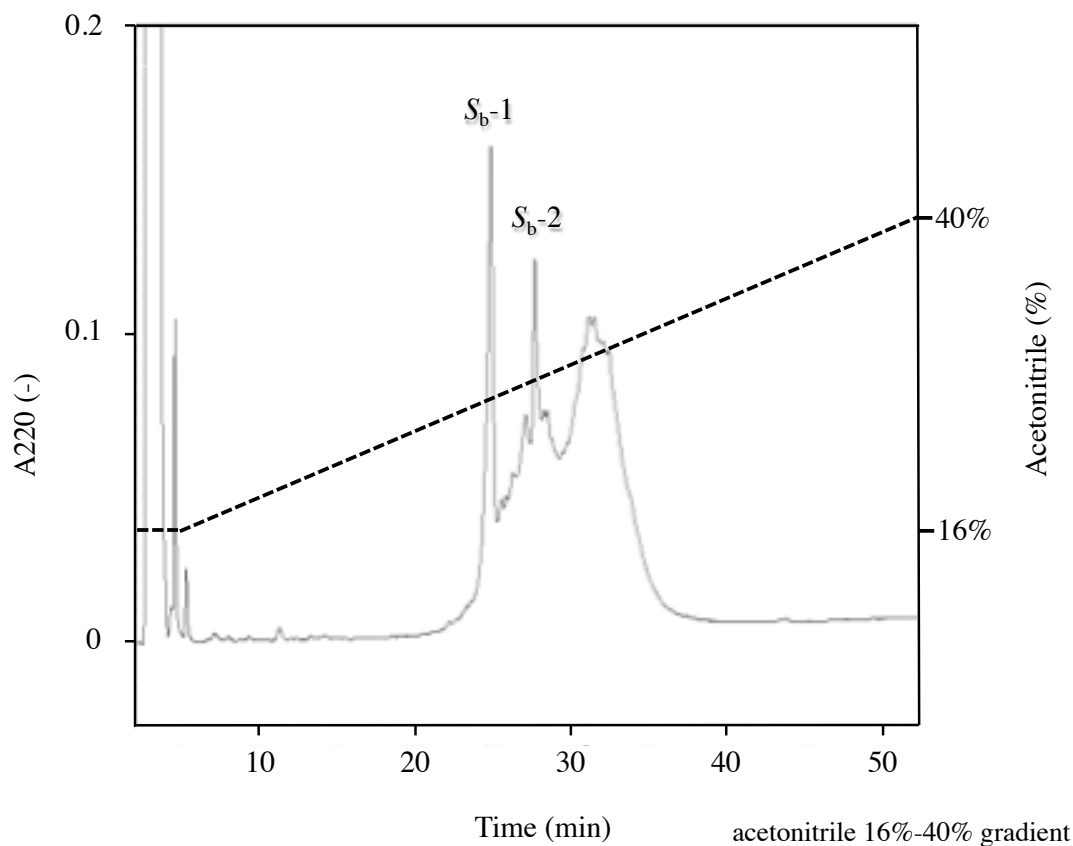


Fig. 1-3. S_b -SP11 のアミノ酸配列と逆相 HPLC による酸化型 S_b -SP11 の精製

A. S_b -SP11 のアミノ酸配列。赤字下線部は推定シグナル配列を示す。B. 化学合成 S_b -SP11 の酸化物を ODS カラム (218TP54, Φ 4.6 mm x 250 mm, Vydac) を用いて、0.1% TFA 中のアセトニトリル濃度を 16%~40%まで 48 min かけて上昇させるグラジエント溶出 (流速 1 ml/min) により精製した。

で精製し、MALDI-TOF-MSにより還元型 S_b -SP11であることを確認した (Fig. 1-4)。次に、酸化還元緩衝液系を用いて徐々に S_b -SP11の再酸化を行い(下里、2002)、逆相 HPLC に供したところ、ジスルフィド架橋結合が異なる2つの主要ピーク (S_b -1、 S_b -2) が得られた (Fig. 1-3B)。MALDI-TOF-MS に供したところ、両ピークともに酸化型の S_b -SP11 を含むことが示された (Fig. 1-4)。

そこで次に、いずれの画分に正しく架橋された生物活性のある酸化型 S_b -SP11 が含まれているのかをバイオアッセイ系により調べることにした (Takayama et al., 2001)。各画分の S_b -SP11 ペプチド水溶液を、 S_b -SRK を発現している柱頭全体に処理し、完全に乾燥させた後に、和合関係となる野生型花粉を受粉させ、アニリンブルー染色により花粉管の伸長を観察した。その結果、 S_b -2 画分に含まれる S_b -SP11 を処理した際には花粉管の伸長が正常に起きることが観察される一方、 S_b -1 画分に含まれる S_b -SP11 を処理した際には不和合反応が誘起され、花粉管の伸長が阻害されることが判明した (Table 1-1, Fig. 1-5)。以上の結果から、 S_b -1 画分に含まれる S_b -SP11 が花粉因子としての機能を有することが明らかとなり、以下の解析では本画分の S_b -SP11 を活性型花粉因子として使用することにした。

Ca²⁺イメージングによる乳頭細胞プロトプラスト実験系の確立

カルシウムセンサータンパク質である Yellow Cameleon3.60 (YC3.60) を発現させた *A. thaliana* を用いて自家受粉を行うと、乳頭細胞内で Ca²⁺濃度の上昇が誘起されることを当研究室矢加部が報告している (矢加部、2009)。Yellow Cameleon は、CFP、カルモジュリン、M13、YFP を順次連結した構成をしており、細胞内の Ca²⁺濃度が上昇すると、カルモジュリンが4つの Ca²⁺を取り込んで活性化し、M13 を引き寄せる。この構造変化が、結果的に CFP と YFP の分子間距離を近づけ FRET を引き起こすため、逆にこの FRET 効率を算出することで細胞内における Ca²⁺濃度の変化を調べるのが可能となっている (Nagai et al., 2004)。

そこでまず、自家受粉時に見られるこの乳頭細胞内の Ca²⁺濃度上昇が SP11 によって直接誘導されるかどうかを先に述べた乳頭細胞プロトプラストの系を使って調べることにした。 S_b -SRK と YC3.60 を乳頭細胞で共発現させた形質転換体 *A. thaliana* から乳頭細胞プロトプラストを作製し、液体培地中に S_b -SP11 ペプチドを終濃度 10 nM となるように加えたところ、添加後約6分で著しい Ca²⁺濃度上昇が観察された (Fig. 1-6A, D)。一方、異なるハプロタイプである *B. rapa*

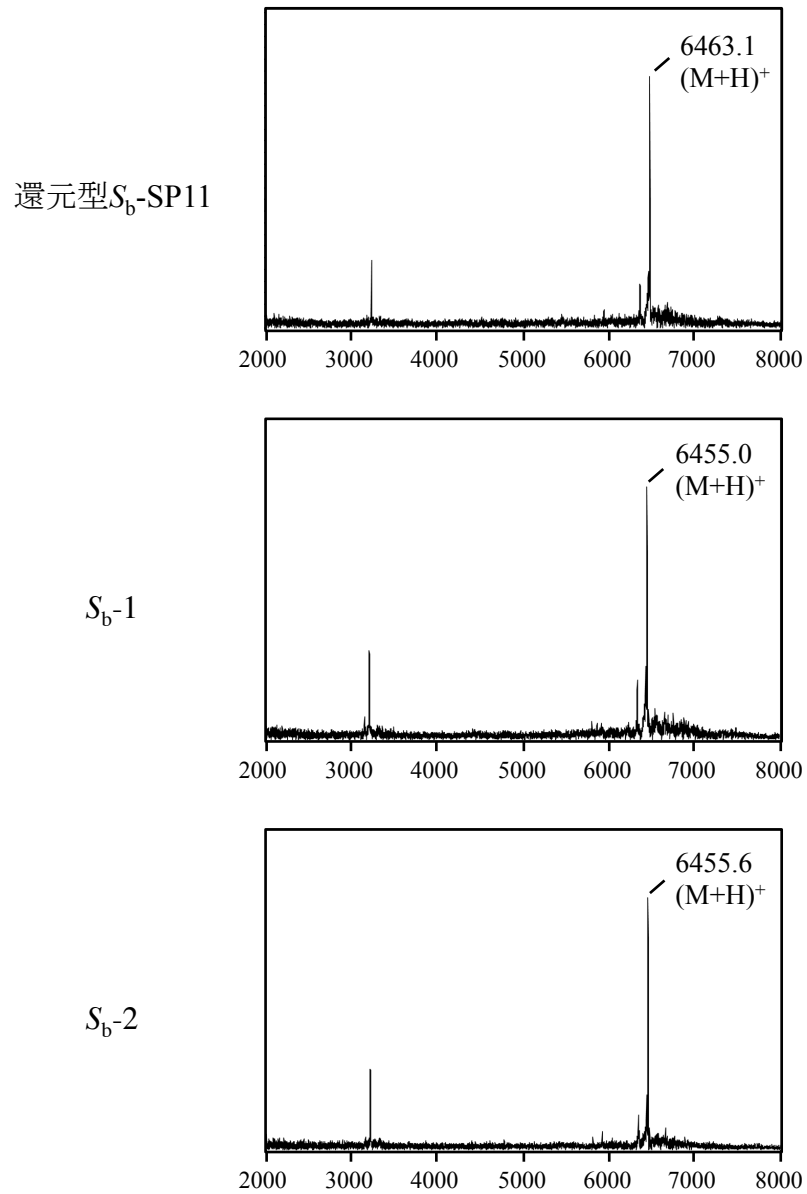


Fig. 1-4. 還元型、酸化型 S_b -SP11 のマスペクトル

逆相 HPLC により精製した還元型、酸化型 S_b -SP11 の分子量をそれぞれ MALDI-TOF-MS を用いて分析した。計算上の還元型 S_b -SP11 の分子量は、MW=6462.5 (平均質量) 酸化型 S_b -SP11 の分子量は、MW=6454.4 (平均質量)。

Table 1-1. S_b -1、 S_b -2 画分 SP11 の花粉側因子としての生物活性検定結果

試料	量 (pmol/柱頭)	柱頭	花粉	和合受粉/試験数
S_b -1	0.4	S_b -SRK	WT	7/10
	0.8	S_b -SRK	WT	4/11
	1.2	S_b -SRK	WT	0/12
S_b -1	0.4	WT	WT	2/2
	0.8	WT	WT	2/2
	1.2	WT	WT	2/2
S_b -2	0.4	S_b -SRK	WT	7/7
S_b -2	0.4	WT	WT	2/2
-		WT	WT	6/6

“-”は、溶媒である (0.05% Tween20) のみを柱頭へと処理したコントロールを示す。

“和合受粉”は、花粉管の伸長が認められた柱頭の数を示す。

本実験には、 S_b -SP11 を受粉させた際に、自家不和合性を示す S_b -SRK 発現柱頭のみを実験に用いた。

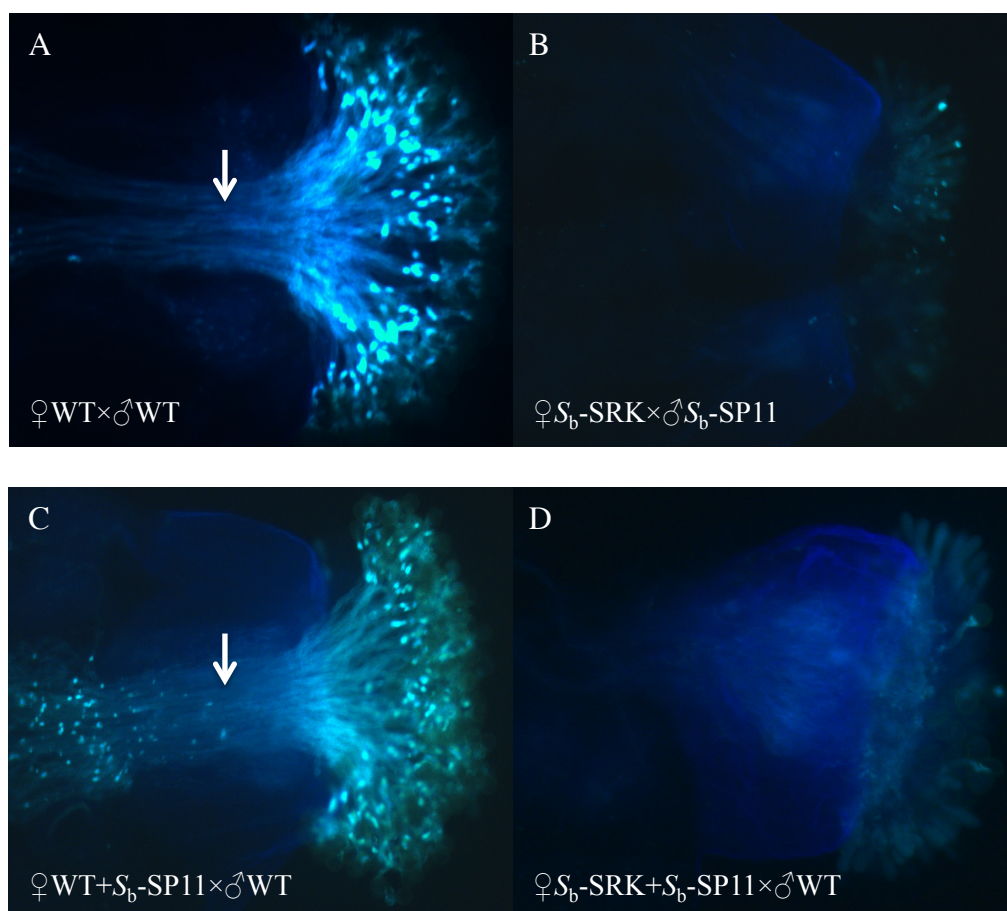


Fig. 1-5. バイオアッセイ法による S_b -SP11 の生物活性の解析例

Table 1-1. に示した S_b -SP11 の生物検定の判定に用いたアニリンブルー染色による和合/不和合受粉の典型的な例を示した。

A. WT の柱頭に WT の花粉を受粉させたもの。**B.** S_b -SRK を発現させた柱頭に、 S_b -SP11 を発現させた花粉を受粉させたもの。**C.** WT の柱頭に精製した S_b -1 画分 SP11 を 1.2 pmol/柱頭となるように塗布した後、WT の花粉を受粉させたもの。**D.** S_b -SRK を発現させた柱頭に精製した S_b -1 画分 SP11 を 1.2 pmol/柱頭となるように塗布した後、WT の花粉を受粉させたもの。矢印は柱頭内に侵入した花粉管を示し、この花粉管の侵入の有無により和合/不和合受粉の判定を行った。

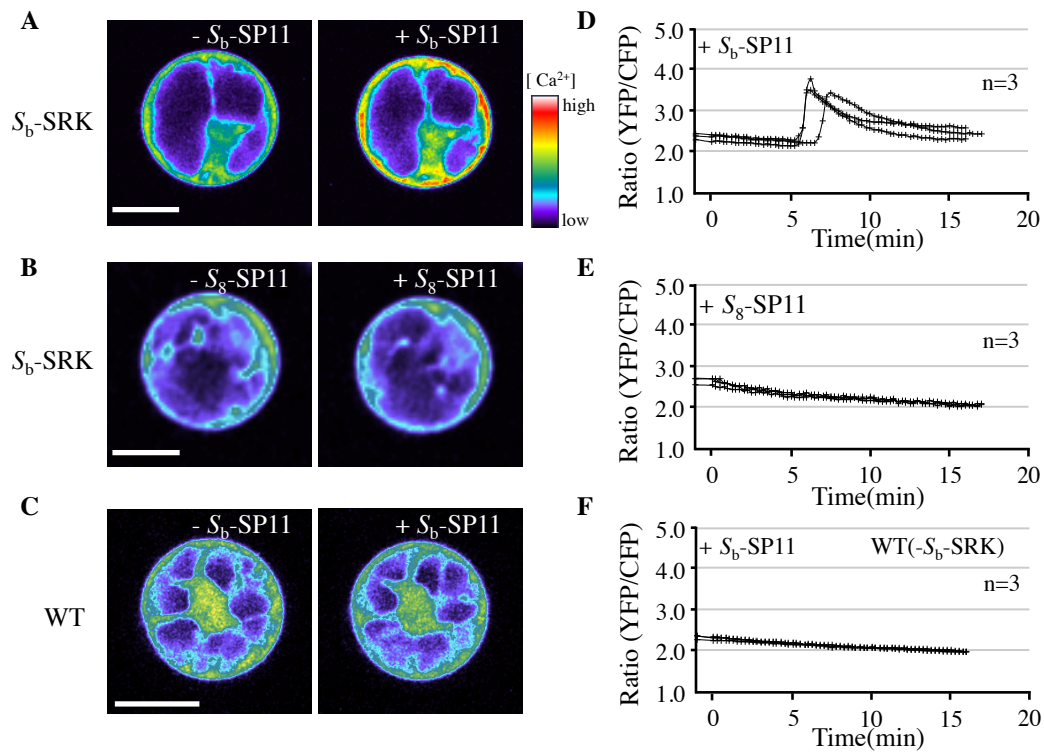


Fig. 1-6. *A. thaliana* 由来の乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca^{2+} イメージング

(A-C) YC3.6 を発現させた乳頭細胞プロトプラストの SP11 処理前 (左) と SP11 処理後 6 分後 (右) の YFP/CFP ratio 画像。Scale bars: 20 μm 。

A. S_b -SRK を発現させた乳頭細胞プロトプラストに S_b -SP11 を処理した際の典型例。**B.** S_b -SRK を発現させた乳頭細胞プロトプラストに S_8 -SP11 を処理した際の典型例。**C.** WT の乳頭細胞プロトプラストに S_b -SP11 を処理した際の典型例。

(D-F) A-C における YFP/CFP ratio の経時変化を各々グラフにプロットしたもの。いずれも SP11 を加えた時点を 0 min とした。

由来の S_8 -SP11 を同様に処理した時には、 Ca^{2+} 濃度上昇は観察されなかった (Fig. 1-6B, E)。さらに、YCのみを発現させた *A. thaliana* を用いて乳頭細胞プロトプラストを作製し、 S_6 -SP11 を処理した時も Ca^{2+} 濃度上昇は観察されなかった (Fig. 1-6C, F)。以上の結果から、本研究により確立した乳頭細胞プロトプラストは SP11 に対する反応性を保持していること、自家受粉時に見られる乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は SP11 と SRK のハプロタイプ特異的な相互作用により直接引き起こされていることが明らかとなった。

不和合反応時に誘起される乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、アブラナ科植物における自家不和合性において共通の現象であることを確認するために、*B. rapa* の S_8 ホモ系統と S_9 ホモ系統から乳頭細胞プロトプラストを作製し、 Ca^{2+} イメージングを行った。*B. rapa* は形質転換が難しく、YC3.60 を乳頭細胞で発現させることは困難であるため、 Ca^{2+} イメージングには Ca^{2+} 指示薬である Fluo4-AM を用いた。Fluo4-AM は脂溶性のアセトキシメチル基が導入されており、これにより細胞内へと容易に取り込まれる構造をしている。細胞内に取り込まれた Fluo4-AM は細胞内のエステラーゼにより加水分解され細胞内に拡散し、 Ca^{2+} 錯体を作製することにより強い蛍光を発する。 S_8 系統から作製した乳頭細胞プロトプラストに Fluo4-AM を取り込ませた後 S_8 -SP11 (終濃度 1 nM) を処理すると強い蛍光の上昇が誘起されたが、 S_9 -SP11 (終濃度 1 nM) を処理してもその上昇は誘起されなかった (Fig. 1-7A, B)。逆に、 S_9 系統から作製した乳頭細胞プロトプラストに S_8 -SP11 を処理しても蛍光の上昇は誘起されなかったが、 S_9 -SP11 を処理すると蛍光上昇が誘起された (Fig. 1-7C, D)。これらの結果から、自家不和合反応時における乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、アブラナ科植物に共通した現象であるということが明らかとなった。

花粉の吸水反応を指標とした乳頭細胞における Ca^{2+} 濃度上昇の効果

これまでの実験から、SRK 下流において誘起される乳頭細胞内のカルシウム濃度上昇が引き金となって、自己花粉の吸水・発芽が阻害されている可能性が考えられる。この仮説を検証する為に、レーザー熱膨張式マイクロインジェクション装置を用いて、乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を人為的に上昇させることにより、受粉反応への影響を解析することにした。レーザー熱膨張式マイクロインジェクション装置は、レーザー吸収剤の高い熱膨張圧を利用して、0.1 μm 先端径の細いガラス針を用いて高い膨圧を持つ植物細胞への試料注入を可能にした装置

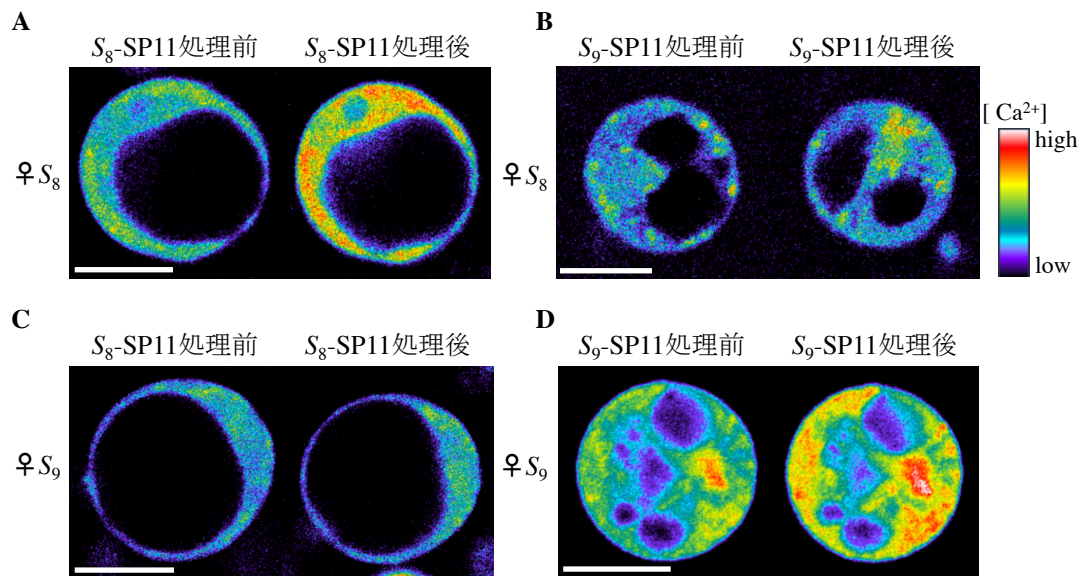


Fig. 1-7. *B. rapa* 乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca^{2+} イメージング

(A-D) Fluo4-AM 処理による *B. rapa* 乳頭細胞プロトプラストの蛍光画像。A. *B. rapa* S_8 ホモ系統由来の乳頭細胞プロトプラストに同一ハプロタイプ由来の S_8 -SP11 を処理したもの。B. *B. rapa* S_8 ホモ系統由来の乳頭細胞プロトプラストに異なるハプロタイプ由来の S_9 -SP11 を処理したもの。C. S_9 ホモ系統由来の乳頭細胞プロトプラストに異なるハプロタイプ由来の S_8 -SP11 を処理したもの。D. S_9 ホモ系統由来の乳頭細胞プロトプラストに同一ハプロタイプ由来の S_9 -SP11 を処理したもの。Scale bars: 20 μm 。

である (Okuda et al., 2009) 。インジェクションに用いた植物体には、細胞膜アンカー型の Yellow Cameleon (YC3.60pm) を発現させた *A. thaliana* を用いた。この、YC3.60pm は、C 末端に細胞膜アンカー配列である CAAX box を付加することで、YC3.60 が細胞膜や小胞体膜などに均一に移行し (Fig. 1-8) 、膜直下の細胞質 Ca^{2+} 濃度の変動をより鋭敏に検出できることを期待して設計されたものである (Nagai et al., 2004) 。インジェクションが成功しているかどうかを確認するために蛍光色素である Alexa Fluor 546 もサンプルと同時にインジェクションを行った。まず、この装置を用いたインジェクションによる細胞へのダメージが正常な受粉反応に影響しないかどうかを確認する為に、Alexa Fluor 546 を添加した水のみを乳頭細胞にインジェクションし、この乳頭細胞に和合関係となる野生型花粉を受粉させ、受粉後約 25 分後に花粉の吸水が起きるかどうかを観察した。その結果、インジェクション後の乳頭細胞では、花粉への水の供給が行われ、花粉が正常に吸水することが確認された。次に、乳頭細胞へ CaCl_2 水溶液のインジェクションを行った。その結果、0.1 mM 以上の CaCl_2 水溶液を乳頭細胞へとインジェクションした時の花粉の吸水率は、水のみをインジェクションした時の花粉の吸水率と比較して有意に低下することが示された (Table 1-2) 。また、自家受粉時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率 (YFP/CFP ratio の上昇率 $=1.00\pm 0.30$) は、0.1 mM と 1 mM の CaCl_2 を乳頭細胞内にインジェクションした際の上昇率 (0.74 ± 0.33 と 1.20 ± 0.54) の中間値に相当することから、乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を自家受粉時とほぼ同程度まで人為的に上昇させると花粉の吸水が有意に阻害されることが明らかとなった (Table 1-2) 。さらに、Cl⁻の影響ではない事を確認する為に、KCl 水溶液を乳頭細胞へとインジェクションしたところ、1 mM から 1 M まで濃度を上昇させても花粉の吸水反応に影響がないことが示された (Table 1-2) 。以上の結果は、SP11/SRK の S ハプロタイプ特異的な相互作用により誘起される乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇が何らかの引き金となり、自己花粉の吸水を阻害していることが強く示唆された。

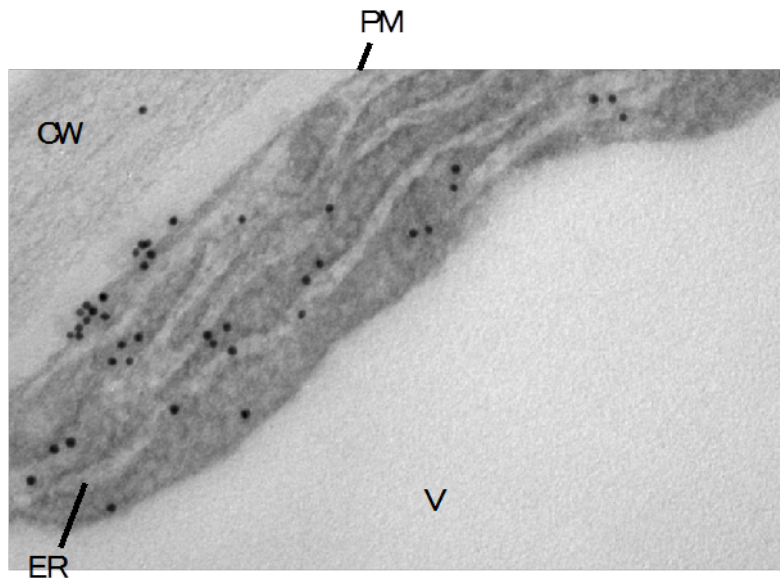


Fig. 1-8. 乳頭細胞における YC3.6pm の局在

YC3.6 のシグナルは細胞膜の細胞質側と ER 膜において観察された。YC3.6 の検出には、anti-GFP mouse antibody (一次抗体)と 10 nm 金コロイド粒子を混ぜた anti-mouse IgG antibody (二次抗体)を使用した。CW: cell wall, PM: plasma membrane, ER: endoplasmic reticulum, V: vacuole. Scale bar: 0.2 μ m.

Table 1-2. 花粉の吸水反応に及ぼす乳頭細胞への Ca^{2+} インジェクションの効果

Pollination	Injected solution	mM	Increase in $[\text{Ca}^{2+}]^a$	Hydrated pollen/Total (%)
S_b -SRK x WT	H ₂ O		0.36±0.30	18/20 (90)
S_b -SRK x WT	CaCl ₂	10	1.43±0.52	1/10 (10)**
		1	1.20±0.54	2/20 (10)**
		0.1	0.74±0.33	15/25 (60)*
S_b -SRK x WT	KCl	1000	0.42±0.78	6/6 (100)
		1	0.45±0.17	5/6 (83)
S_b -SRK x S_b -SP11	- ^b		1.00±0.30	0/7 (0)
S_b -SRK x WT	- ^b		0.09±0.15	7/7 (100)

^a “Increase in $[\text{Ca}^{2+}]$ ” was calculated by (“YFP/CFP ratio just after injections” – “YFP/CFP ratio before injections”) and normalized against the corresponding value for self pollination (S_b -SRK x S_b -SP11). Data are expressed as means ± s.e.

^b “-” means no injection.

* $P < 0.05$ with Fisher’s exact probability test versus the H₂O-injected control.

** $P < 0.001$ with Fisher’s exact probability test versus the H₂O-injected control.

1-4 考察

本章では、まず不和合受粉時にみられる乳頭細胞内生理変化が SP11 と SRK の相互作用によって誘起されているのかどうかを明確にするために乳頭細胞プロトプラストを用いた実験系の確立を行った。その結果、SP11 に対する反応性を保持した乳頭細胞プロトプラストを作製することに成功した。また、その乳頭細胞プロトプラストを使った実験から、不和合受粉時において観察された乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、ハプロタイプ特異的な SP11 と SRK の相互作用によって直接誘起されることが明らかとなった。さらに、レーザーマイクロインジェクションを用いて乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を人為的に上昇させると花粉の吸水反応が阻害されることも明らかとなった。

これまでのアブラナ科植物における自家不和合性では、ARC1 を介した情報伝達系モデルが提唱されている (Fig. 1A)。しかし、*B. napus* の *ARC1* のアンチセンス発現抑制株が完全な自家和合性を示さないという実験結果や (Stone et al., 1999)、*ARC1* の発現が 1/10 程度に低下した *B. rapa* の自然変異系統が完全な自家不和合性を保持しているという観察結果 (Rea et al., 2010)、*A. thaliana* では *ARC1* オーソログ遺伝子は第 2 番染色体上 (At2g34250-At2g34290) で完全に偽遺伝子化しており、さらに 58% のアミノ酸同一性の認められる ARC1 ホモログ (*PUB17*, At2g28930) まで破壊した T-DNA 挿入ラインでも *SP11/SRK* 導入により自家不和合性を獲得するという実験結果から (Rea et al., 2010; Kitashiba et al., 2011)、ARC1 がアブラナ科植物の自家不和合性情報伝達系において決定的な下流因子として機能している可能性は疑問視されてきている。本研究により得られた結果は、これまでに提唱されている ARC1 を介した自家不和合情報伝達経路とは全く異なる情報伝達経路の存在を示唆するものであり、*Brassica* 属と *Arabidopsis* 属両方の自家不和合性において共通する Ca^{2+} を介した情報伝達経路が、花粉の吸水阻害に至る自家不和合性情報伝達系の主要経路として機能していることを示すものである。

細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、アブラナ科植物の自家不和合性とは異なる機構を有するケシ科植物 *Papaver rhoeas* の自家不和合性反応にも関与することが報告されている (Franklin-tong et al., 1993)。ケシ科植物における自家不和合性反応は、雌ずい側因子である分泌型低分子タンパク質 PrsS (*Papaver rhoeas* style S) が、花粉側因子の 3~5 回の推定膜貫通領域を持つチャネル様タンパク質 PrpS (*Papaver rhoeas* pollen S) と結合することにより花粉内で誘起される。両因子が結合する

と、花粉管側方から Ca^{2+} が流入し、アクチン骨格が崩壊し、最終的に花粉管の細胞死が誘起されることが示唆されている (Wheeler et al., 2009; Wheeler et al., 2010)。さらに、動物の自家不和合性においても Ca^{2+} 濃度の上昇という現象が観察されている。脊索動物尾索類で雌雄同体であるカタユレイボヤの自家不和合性は、*A* 遺伝子座と *B* 遺伝子座の 2 つにより制御されており (Harada et al., 2008)、両遺伝子座はそれぞれ精子側因子であるポリスチン 1 様受容体 *s*-Themis と卵子側因子であるフィブリノーゲン様タンパク質 *v*-Themis の両者を発現させる。そして、*A* と *B* の 2 遺伝子座産物の各ペアが相互作用した際に自己と認識し、精子側で Ca^{2+} の流入が誘起され、受精能を喪失することで自家受精を回避していることが報告されている (Saito et al., 2012)。このように、被子植物と雌雄同体生物における自家不和合性の分子機構はそれぞれ異なるが、雌雄因子が結合した後の Ca^{2+} 濃度上昇という現象は、これらの生物が自殖を回避するために有している共通した情報伝達機構なのかもしれない。

自家不和合性反応は、自他識別機構という点で自然免疫応答と比較されることが多いが、情報伝達機構等においても多くの共通点が認められる。特に植物の自然免疫系においては、 Ca^{2+} を介した情報伝達系の関与が報告されている (Hodkin et al., 1998; Sanabria et al., 2008; Cheval et al., 2013)。植物は、病原菌が侵入してきた際に pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) あるいは microbe-associated molecular patterns (MAMPs) と呼ばれる植物病原菌に存在する分子群を認識することで、免疫応答を誘導する。これらの病原菌由来の分子群を認識する特異的な受容体の下流で、一過的な細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇が誘起されることが報告されている (Lecourieux et al., 2006; Dodd et al., 2010)。アブラナ科植物における自家不和合性の様に、リガンドと受容体の下流で Ca^{2+} 濃度上昇が観察される例として、病原体由来のエリシターである *flg22* とその受容体である FLS2 (flagelin sensing 2) (Jewroutzki et al., 2010; Ma et al., 2012)、翻訳伸長因子 EF-Tu (elongation factor-thermo unstable) と EFR (Jewroutzki et al., 2010)、キチンオリゴ糖と CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) (Wan et al., 2012) が同定されているが、これらの受容体の下流で機能する Ca^{2+} 輸送体分子は明らかとなっていない。

これまでに自然免疫情報伝達系の下流で機能する Ca^{2+} 輸送体としては、CNGC2 (cyclic nucleotide gated channel 2) が変異体の解析により同定されている (Ali et al., 2007, Ma et al., 2009)。CNGC2 は cAMP を介してチャネルが開閉する構造をしており、病原体由来のエリシターが受容体へと結合すると、細胞質内で cAMP の産生が誘起されることで CNGC2 を活性化し、 Ca^{2+} を細胞内へと流入

させると考えられている。しかし、CNGC2 以外に自然免疫系で機能する Ca^{2+} 輸送体は未だ明確に発見されておらず、 Ca^{2+} 輸送体の探索・解析は現在も進められている。

免疫系において、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘導されるまでに要する時間は、エリシター処理後数秒から数分以内であることがこれまでに報告されている (Lecourieux et al., 2002; Lecourieux et al., 2005; Blume et al., 2000)。例えば、グラム陰性菌由来のエリシター (lipopolysaccharides) により誘導される Ca^{2+} 濃度上昇は、エリシター処理後 1 分以内に誘導されることが明らかとなっている (Lecourieux et al., 2002)。一方、自家受粉時に乳頭細胞内で誘起される Ca^{2+} 濃度上昇は、受粉後約 5 分以内に誘導され始め、約 6 分後に最大に達することが、当研究室岩野により観察されている (岩野、未発表)。これは免疫応答時の Ca^{2+} 濃度上昇速度と比較すると、不和合反応時に誘導される Ca^{2+} 濃度上昇の速度は遅い。その理由としては、自家受粉時には、SP11 が乳頭細胞壁へ侵入し、SRK へと到達する必要があるため Ca^{2+} 濃度上昇が誘起されるまでに時間がかかることが考えられる。従って、細胞壁を取り除いた乳頭細胞プロトプラストを用いた場合は、花粉を受粉させた時よりも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に要する時間が早くなることが期待されたが、自家受粉時の速度とほぼ同じであるという結果が得られた。プロトプラストにおいて Ca^{2+} 濃度が上昇するまでに時間を要する原因は不明であるが、プロトプラスト化に伴い SRK の局在性が失われ、細胞膜全体に SRK が散在することで活性化までに時間が要する可能性、または、SP11 が培地中に拡散してから、SRK を活性化するまでの速度を反映しているのかもしれない。

続く第 2 章では、薬理的解析と変異株を用いた表現型解析を行い、不和合反応時に関与する Ca^{2+} 輸送体分子を明らかにすることを目指した。

第2章 自家不和合性反応に関わる Ca^{2+} 輸送体の同定

2-1 序

第1章で筆者が行った実験結果から、SP11/SRKの相互作用によって、乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘起されること、また、レーザーマイクロインジェクション装置を用いて乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を人為的に上昇させると花粉の吸水反応が阻害されることが明らかとなった。これらの結果は、SP11とSRKの相互作用において誘起される乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が、花粉の吸水阻害に至る自家不和合性情報伝達系の主経路として機能していることを示唆しているが、この Ca^{2+} 濃度上昇に関与する輸送体分子については明らかとなっていない。

本章では、不和合反応時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与する輸送体分子を明らかにすることを目的とし、まず、前章において確立した乳頭細胞プロトプラストを用いた薬理的解析により、輸送体候補因子の絞り込みを行った。さらに、絞り込んだ候補因子の遺伝子に変異を持つ株を取得し、不和合反応時における Ca^{2+} 動態の変化を解析することで、自家不和合性反応において機能する Ca^{2+} 輸送体分子を明らかにすることを試みた。

2-2 材料・方法

阻害剤を用いた Ca²⁺輸送体候補因子の絞込み

用いた阻害剤は、GdCl₃ (Wako)、LaCl₃ (Wako)、6,7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione (DNQX, Tocris)、6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX, Tocris)、DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5, Sigma)、alloxan monohydrate (Sigma)、U73122 (Sigma)、trifluoperazine (TFP, Sigma)、verapamil (Sigma)、mibefradil (Sigma)、carboxyeosin (Invitrogen)、KB-r (Sigma)の 12 種類を用いた。GdCl₃、LaCl₃、DNQX、CNQX、AP-5、alloxan、verapamil、mibefradil はそれぞれ H₂O で溶解し、使用した。U73122、TFP、KB-r はそれぞれ DMSO で溶解し、使用した。DMSO は final 0.1%以下となるように調整し、使用した。

それぞれの阻害剤をプロトプラスト培地に加えた後 15 分程放置した。その後、前章で記述した「乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca²⁺イメージング方法」と同様に SP11 を加えた後の、細胞内カルシウム濃度の変動を観察した。また、使用した Ca²⁺-free 培地は、Murashige and Skoog salt mixture の組成から CaCl₂・2H₂O を除いたものをそれぞれ混合し、作製した。次にその組成を示す。21 mM NH₄NO₃, 19 mM KNO₃, 3 mM CaCl₂・2H₂O, 1.5 mM MgSO₄・7H₂O, 1.2 mM KH₂PO₄, 0.1 mM H₃BO₃, 0.1 mM MnSO₄・4H₂O, 0.03 mM ZnSO₄・7H₂O, 5 μM KI, 1 μM Na₂MoO₄・2H₂O, 0.1 μM CuSO₄・5H₂O, 0.1 μM CoCl₂・6H₂O, 0.1 mM Na₂-EDTA, 0.1 mM FeSO₄・7H₂O, 0.1% myo-inositol, 1×B5 vitamin, 10% sucrose, 0.55 M sorbitol, pH 5.7 に調整したものを使用した。

グルタミン酸受容体阻害剤 AP-5 を用いた受粉試験

25 mM AP-5, 0.025% Tween20 水溶液を S_b-SRK を発現させた *A. thaliana* の一柱頭あたり 0.1 μl (AP-5: 2.5 nmol) となるように処理して、室温で 1 時間程乾燥させた。コントロール実験として、0.05% Tween20 のみを柱頭に塗布したものも、同時に行った。その後、柱頭に S_b-SP11 を発現させた花粉を受粉させ、室温で 3 時間置き、アニリンブルー染色により花粉管の柱頭への伸長の有無を観察した。

RNAi コンストラクトの作製

相補的な二本鎖 RNA を発現させるプロモーターには、柱頭で高発現である *B. rapa* の *S₉* ハプロタイプ由来の *SLG* プロモーター (2.2 kb) を用いた。*SLG* プロモーターの 3'末端側に *Xba*I、*Kpn*I の制限酵素サイト、リンカー領域、*Xho*I、*Sac*I の制限酵素サイト、*Nos terminator* が連結された *SLGp/pKRH102* バイナリーベクターは、当研究室杉村により既に作製されていたので、これを使用することにした (杉村、2008)。*GLR3.7*、*GLR3.5*、*GLR3.3*、*GLR1.3* の 4 つの遺伝子に対する RNAi コンストラクトを作製するために用いた鋳型となる cDNA は、開花当日の *A. thaliana* C24 株の柱頭から RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した total RNA より、SuperScript®III (Invitrogen) を用いてオリゴ dT プライマーにより逆転写反応を行い調整した。それぞれの遺伝子の特異的な配列部分を RNAi の標的領域とし、標的領域のセンス側、アンチセンス側の両方についてクローニングを行った。センス側の Forward primer には *Xho*I、Reverse primer には *Sac*I をそれぞれ付加し、アンチセンス側の Forward primer には *Xba*I、Reverse primer には *Kpn*I を付加してプライマーの設計を行った。使用したプライマーセットの配列を次に示す。

GLR3.7: アンチセンス側 Forward primer

(5'-ATCCACTAGTTCTAGATCCCCAACACGGTGCATA-3') & Reverse primer (5'-TTTCTACAGGACGTGGTACCCAACAGCTTCCCTCTGCTAT-3'), センス側 Forward primer (5'-GGGAAAAGTGCTCGAGCAACAGCTTCCCTCTGCTAT-3') & Reverse primer (5'-GATCGGGGAAATTCGAGCTCTCCCCAACACGGTGCATAA-3').

GLR3.5: アンチセンス側 Forward primer

(5'-ATCCACTAGTTCTAGATCCCCAACACGGTGCATA-3') & Reverse primer (5'-TTTCTACAGGACGTGGTACCCAACAGCTTCCCTCTGCTAT-3'), センス側 Forward primer (5'-GGGAAAAGTGCTCGAGCCTAATATGTGGCGTCGTTT-3') & Reverse primer (5'-CGATCGGGGAAATTCGAGCTCTCACTGTGGAGTTTCGTGAT-3').

GLR3.3: アンチセンス側 Forward primer

(5'-ATCCACTAGTTCTAGAGATCGTGTTGATCCCGATG-3') & Reverse primer (5'-TTTCTACAGGACGTGGTACCACGCGGAGCTCGAATCAGAC-3'), センス側 Forward primer (5'-GGGAAAAGTGCTCGAGACGCGGAGCTCGAATCAGAC-3') & Reverse primer (5'-GATCGGGGAAATTCGAGCTCGATCGTGTTGATCCCGATGT-3').

GLR1.3: アンチセンス側 Forward primer

(5'-ATCCACTAGTTCTAGAAAAGCCGAAACCGTTGGTG-3') & Reverse primer

(5'-TTTCTACAGGACGTGGTACCTGACGGTACAACAGATACGA-3'), センス側 Forward primer (5'-GGGAAAAGTGCTCGAGTGACGGTACAACAGATACGA-3') & Reverse primer (5'-GATCGGGGAAATTCGAGCTCAAAGCCGAAACCGTTGGTGG-3'). PCR の反応条件は [95°C, 1min; (95°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 68°C, 30 sec) × 40 cycles; 68°C, 7 min] で行った。得られた PCR 産物は電気泳動後、*FastGene Gel/PCR Extraction Kit* (Nippon genetics co. ltd) を用いてゲルより回収・精製した。ライゲーション反応は In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer (Clontech) を用い、添付のプロトコールに従って行った。バイナリーベクターを *XbaI*, *KpnI* 処理し、ゲルより回収・精製した後、アンチセンス側の DNA 断片を加え、ライゲーション反応を行った。50°C で 15 分処理した後、大腸菌宿主 DH5α を形質転換し、アンチセンス側のみが導入されたプラスミド産物を得た。次に、このプラスミドを *XhoI*, *SacI* 処理し、先と同様の方法でセンス側の DNA 断片を導入し、それぞれの RNAi コンストラクトを作製した。作製した発現ベクターは精製後、*Agrobacterium tumefaciens* pMP90 株に形質転換を行った。

A. thaliana C24 形質転換体の作出

形質転換に用いた植物体は、既に *S_b-SRK* と *YC3.60* の遺伝子を導入した形質転換体 *A. thaliana* C24 を使用した (矢加部、2009)。プラスミドを導入した *Agrobacterium* を 60 µg/ml カナマイシン、15 µg/ml ゲンタマイシンを含む LB 培地に植菌し、28°C で一晚培養した。培養した *Agrobacterium* 溶液を遠心分離 (2,300 × g, 5 min, 4°C) を行い、上清を取り除いた。ここに浸潤用懸濁培地 (5%(w/v) Sucrose, 500 µl/l FZ-77 (v/v)) を培養した菌液と等量入れ、再び懸濁し遠心分離を行い、菌体を洗浄した。再び浸潤用懸濁培地を菌液と等量入れ、懸濁を行った。この懸濁液に、開花した花や果実をあらかじめ取り除いた植物体を浸し、余分な菌液を落とした後、室温、暗条件下に置いた。24 時間後、22°C、14 時間明期、10 時間暗期の光周期条件のバイオトロンへと戻し、2~4 週間生育させ、種子を回収した。回収した乾燥種子 0.06 g (約 3000 粒) を 50 ml チューブにとり、グリーンベンチ内で 70%エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (次亜塩素酸ナトリウム溶液を滅菌水で 2 倍希釈した溶液に Tween20 を数滴加えたもの) で順次滅菌処理を行った。滅菌水で洗浄した種子を 0.1%寒天溶液にいれ、20 µg/ml ハイグロマイシンを含む GM 培地 (1 × Murashige and Skoog salt mixture, 100 mg/l myo-inositol, 1 × B5 vitamin, 1% sucrose, 0.8% agar powder, pH5.7) に播種した。播

種した形質転換体種子は、4°C、暗所で3~4日間低温処理を行った後、22°C、14時間明期、10時間暗期条件バイオトロンで1~2週間栽培し、選抜を行った。ハイグロマイシン耐性を示した株のみを滅菌済みの土へ移した。形質転換体が成長後、RNAiにより導入遺伝子の発現が抑制されている株を調べるために定量RT-PCRを行った。定量RT-PCRに用いたtotal RNAは開花当日の*A. thaliana* C24の柱頭から、RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従い、抽出、精製を行った。使用したプライマーを次に示す。

GLR3.7 RNAi 株: GLR3.7_qPCR-F2 (5'-AAGACAACCTCAGCACAATGC-3') & GLR3.7_qPCR-R2 (5'-AGAACCATCAATAGGAAGAGC-3').

GLR3.3 RNAi 株: GLR3.3_qPCR-F (5'-CTCAGCGGAACAAAGTTTTC-3') & GLR3.3_qPCR-R (5'-TACAGAACATTGTGGTCCTATAATC-3').

GLR1.3 RNAi 株: GLR1.3_qPCR-F (5'-GCTCAATGGAAGTAACTACGACAATC-3') & GLR1.3_qPCR-R (5'-TGAATGGCAACGTAAAGTCAACATAC-3').

定量的 RT-PCR には、Quanti Fast SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いた。反応液の組成、反応時間は添付のプロトコールに従い、検出は LightCycler®480 System I (Roche) により行った。内部標準としては *GAPDH* (At3g26650) を用い、相対定量的解析には、LightCycler®480 Software release 1. 5. 0 SP4 Version 1. 5. 0. 39 を用いた。なお、内部標準として用いた *GAPDH* のプライマーには、*GAPDH*-F (5'-GACCTTACTGTCAGACTCGAG-3') と *GAPDH*-R (5'-CGGTGTATCCAAGGATTCCT-3') を用いた。

TILLING による変異株スクリーニング

TILLING による変異株スクリーニングに用いた材料及び方法は、当研究室 Lai らによって既に確立されているので、それに従って行った (Lai, 2012)。グルタミン酸受容体のゲノムは GLR3.7 (3499 bp)、GLR3.5 (3441 bp)、GLR3.3 (3215 bp)、GLR1.3 (2962 bp) とサイズが大きいため、それぞれのグルタミン酸受容体のスクリーニングは、ゲノム領域を3分割して行い、ナンセンス変異株が取得できたところでスクリーニングを終えた。本実験で使用した蛍光プライマーセットを次に示した。

GLR3.7: GLR3.7_F1_Til (5'-FAM-CTTGCTTAGTTCTCTAATCTTCTCA-3') & GLR3.7_R1-2_Til (5'-VIC-CTTCAAGGCGTTTTAGAGTACCT-3');
GLR3.7_F2-2_Til (5'-FAM-TGCTCAGAATTTTTGATATAGCG-3') &

GLR3.7_R2_Til (5'-VIC-TAGATGTATCAGAAAATCACCAAGAA-3');
GLR3.7_F3_Til (5'-FAM-GAACATCGCATCAATGAAGATT-3') & GLR3.7_R3_Til
(5'-VIC-GGTTCTTTACCAGCTTTTTTATGT-3').

GLR3.5: GLR3.5_F1_Til (5'-FAM-GTTCGATCAGATTTTTTTCTAACTC-3') &
GLR3.5_R1_Til (5'-VIC-CATCATCACTTTTTAGACTCTCCTT-3');
GLR3.5_F2-2_Til (5'-FAM-CAAATCTCTTGGAATGATGGG-3') & GLR3.5_R2_Til
(5'-VIC-ATTGTGTGCATACTGTGAGAGAAG-3').

GLR3.3: GLR3.3_F1_Til (5'-FAM-TGCTGTCTTAATTCGTACCATTTC-3') &
GLR3.3_R1_Til (5'-VIC-AACTTATCTAAACCCCGGGCTA-3').

GLR1.3: GLR1.3_F1_Til (5'-FAM-CGGCATGGGTTTATATAACAAC-3') &
GLR1.3_R1_Til (5'-VIC-CTTATCATTTAGTTGGAAATCACCA-3');
GLR1.3_F2_Til (5'-FAM-TTCACTTTGAGATGGAGAAAATC-3') &
GLR1.3_R2_Til (5'-VIC-CTATTAAGACCCAATGATCTCATTG-3').

96-well thermal cycler (Astech) を用い、以下の条件で PCR 反応を行った。

GLR3.7-1: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 58°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 51°C 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 20 cycle; 72°C, 7 min].

GLR3.7-2: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 52°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) ×
8 cycle; (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 20 cycle; 72°C, 7 min].

GLR3.7-3: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 51°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 44°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 20 cycle; 72°C, 7 min].

GLR3.5-1: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 52°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 20 cycle; 72°C, 7 min].

GLR3.5-2: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 52°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 20 cycle; 72°C, 7 min].

GLR3.3-1: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 54°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 47°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 22 cycle; 72°C, 7 min].

GLR1.3-1: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 52°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 22 cycle; 72°C, 7 min].

GLR1.3-2: [94°C, 2min; (94°C, 30 sec; 52°C (-1°C/cycle), 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec)
× 8 cycle; (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min 30 sec) × 22 cycle; 72°C, 7 min].

PCR 反応が終わった後、ヘテロ二本鎖にするために 95°C, 10 min インキュベ
ートし、95°Cから 85°Cまで温度を下げるときに-2°C/sec、85°Cから 25°Cまで温度を
下げるときに-0.1°C/sec と徐々に温度を下げた。5 µl の PCR 産物を CEL 1
SURVEYOR nuclease (Transgenomic) を加えて 45°C, 15 min 処理した後、5 µl の
150 mM EDTA を加えて反応を止めた。Sephadex G-50 resin (Amersham Pharmacia

Biotech) を用いてサンプルの精製を行い、そこに 9.9 μ l の Hi-Di Formamide と 0.1 μ l の MapMarker® 1000 size standard (BioVentures) を混ぜた total 10 μ l の溶液を精製後サンプルに加え、95°C で 3 分間ヒートショックを行ったものを ABI 3730x1 (96-capillary) sequencer にかけた。データの解析には、GeneMapper® 4.0 fragment analysis software (Applied Biosystems) を用いた。

GLR3.7 相補試験用コンストラクトの作製

相補試験用のコンストラクトは、まず *GLR3.7* のプロモーター領域をクローニングし、その後、*GLR3.7* の cDNA コーディング配列を連結する事により作製した。プロモーター領域のクローニングには *A. thaliana* C24 から抽出したゲノム DNA を用いた。また、*GLR3.7* のプロモーター領域は Roy らの文献で使用されているのと同様の領域を使用した (Roy et al., 2008)。また、プロモーター領域を増幅するプライマーは、*GLR3.7* の翻訳開始点 (ATG) の上流 979 bp から下流 15bp までを増幅するように設計し、クローニングを行ったプライマーは、GLR3.7p-F(5'-CTGTCGATATCAAAGTGCTGGATTCTCCT-3') & GLR3.7p+ATG-R (5'-AATGCCCAGTCCCATGGAGATAATGCAATC-3') を用い、反応は、[94°C, 2 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 15 sec; 68°C, 1 min) \times 35 cycle; 68°C, 2 min] で行った。次に、*GLR3.7* のクローニングを行った。クローニングするために鋳型として用いた cDNA は、*A. thaliana* C24 株の葉から RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した total RNA より、SuperScript®III (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い合成したものを使用した。コード領域を増幅するプライマーは、*GLR3.7* 翻訳開始点の上流 15 bp から終止コドンまでを増幅するように設計し、クローニングを行った。プライマーには、GLR3.7p+ATG-F (5'-GATTGCATTATCTCCATGGGACTGGGCATT-3') & GLR3.7_cloning-R (5'-TCAATTCGTGGTACCTCAGTATC-3') を用い、反応条件は [94°C, 2 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 15 sec; 68°C, 3 min) \times 35 cycle; 68°C, 5 min] で行った。それぞれ増幅したプロモーター領域と遺伝子領域を連結させるために、これら 2 つの PCR 産物を混ぜたものをテンプレートとして、GLR3.7p-F & GLR3.7_cloning-R のプライマーを用い PCR 反応を行った。反応条件は、[94°C, 2 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 15 sec; 68°C, 3 min) \times 35 cycle; 68°C, 5 min] で行い、増幅産物は pCR®8/GW/TOPO®(Invitrogen) に TA クローニングし、塩基配列を確認した。その後、このコンストラクトを *EcoRI* で処理することで GLR3.7p:GLR3.7 部分を抜き出して、T4 DNA Polymerase (TAKARA) を用いて平滑末端化処理を行い、

pCAMBIA バイナリーベクターへと導入した。pCAMBIA へと導入するためにまず、当研究室で作製された AtS1p/pCAMBIA から *Hind*III と *Bam*HI 処理により AtS1p 領域を抜き取り、平滑末端処理後、GLR3.7p:GLR3.7 とライゲーションを行い GLR3.7p:GLR3.7/pCAMBIA とした。

2-3 結果

薬理学的手法による Ca^{2+} 輸送体分子の性状解析

不和合反応時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与する輸送体分子の実体を明らかにするために、まず、 Ca^{2+} 供給源が細胞膜を介しての細胞外からの流入であるのか、または細胞内小器官からの放出によるものなのかを明確にすることにした。まず、細胞外からの Ca^{2+} 流入の可能性について検証するため、細胞膜上の Ca^{2+} チャネルに対する阻害剤の GdCl_3 と LaCl_3 の 2 種について薬理学的効果を解析した (Knight et al., 1997)。各阻害剤を終濃度 1 mM となるように予め乳頭細胞プロトプラストの培地に加え、その後 S_b -SP11 を処理したところ、 Ca^{2+} 濃度上昇が完全に阻害されることが明らかとなった (Fig. 2-1A, B)。さらに、 Ca^{2+} -free にした培地中の乳頭細胞プロトプラストに S_b -SP11 を処理したところ、 Ca^{2+} 濃度上昇は誘起されなかった (Fig. 2-1C)。これらの結果から、不和合反応時に誘起される乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇には、細胞膜を介した細胞外からの流入が必須であることが明らかとなった。

次に、この Ca^{2+} 濃度上昇に、どのような輸送体、輸送体関連分子が関与しているのかを明らかにするために、各種阻害剤を用いた薬理的解析によって、候補因子の絞込を行うことにした。使用した Ca^{2+} 輸送体阻害剤は次に示すとおりである。グルタミン酸受容体阻害剤としては、神経伝達系の研究分野で広く用いられている競合阻害剤である、DNQX、CNQX、AP-5 の 3 種類を用いた (Michard et al., 2011)。Cyclic nucleotide によって開閉する CNGC (Cyclic nucleotide gated channel) に対する阻害剤として、alloxan を使用した (Ma et al., 2009)。また、cAMP 作動型陽イオンチャネルを阻害する作用を有したカルモジュリン阻害剤として、trifluoperazine (TFP) を使用した (Jammes et al., 2011)。さらに、 Ca^{2+} チャネルそのものに結合することによって細胞内へと Ca^{2+} が流入するのを阻害する電位依存性 Ca^{2+} チャネルの阻害剤として、高電位活性型の L 型電位依存 Ca^{2+} チャネル阻害剤には verapamil、低電位活性型の T 型電位依存 Ca^{2+} チャネル阻害剤には mibefradil を使用した (White, 2000)。 $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介した Ca^{2+} の流入を特異的に阻害する $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体阻害剤として、KB-r を使用し (Iwamoto et al., 1996)、 Ca^{2+} の排出時に作用する細胞膜型 Ca^{2+} -ATPase の阻害剤には carboxyeosin を使用した。また、 Ca^{2+} 輸送体を直接阻害するものではないが、イノシトール三リン酸を介した細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇に関与するホスホリパーゼ C 活性を阻害する U73122 も使用した (Parre et al., 2007)。これら阻害剤の存在下における、 S_b -SP11 処理前後の ratio 値 (YFP/CFP) の変化 (上昇値)

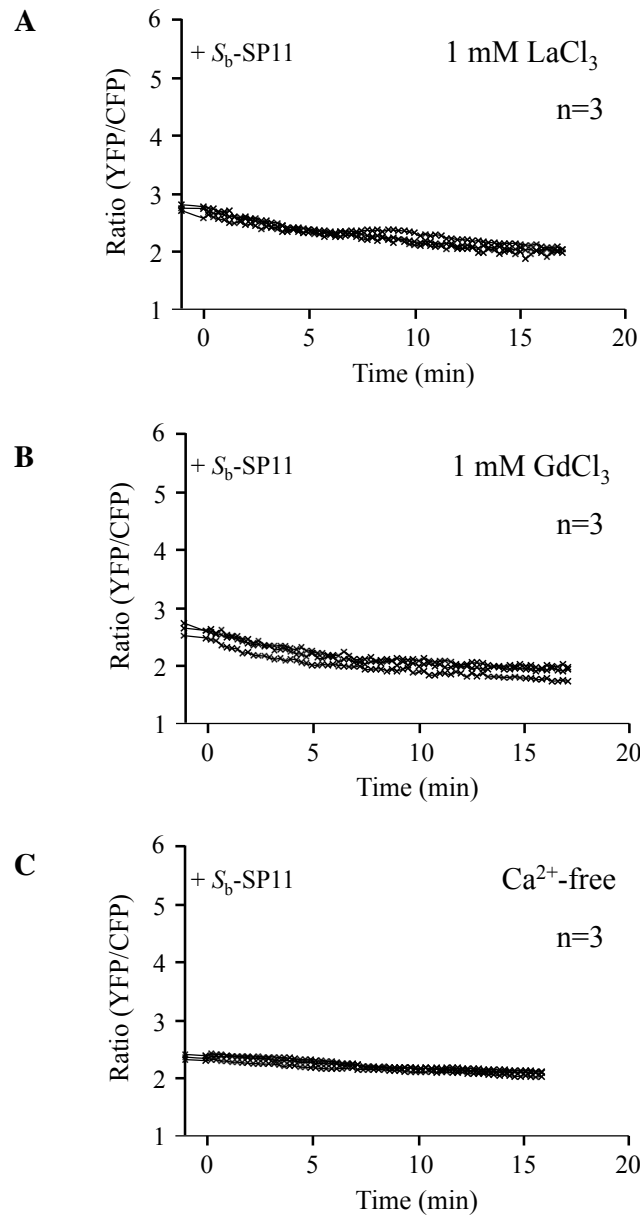


Fig. 2-1. 細胞膜局在型 Ca^{2+} チャネル阻害剤、 Ca^{2+} -free 培地による不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇の抑制

(A-C) SP11 処理後の YC3.60 を発現させた乳頭細胞プロトプラスト全体の YFP/CFP ratio の経時変化をプロットしたもの。A. 1 mM LaCl_3 で処理した後、 S_b -SP11 を加えたもの。B. 1 mM GdCl_3 で処理した後、 S_b -SP11 を加えたもの。C. プロトプラストを Ca^{2+} -free の培地に置換し、 S_b -SP11 を加えたもの。いずれも S_b -SP11 を加えた時点を 0 min とした。

を、阻害剤未処理の場合と比較することにより、 Ca^{2+} 流入に関わる輸送体の特定を試みた (Fig. 2-2)。その結果、グルタミン酸受容体の阻害剤である AP-5 の存在下で (終濃度 1 mM または 0.5 mM)、 S_b -SP11 添加により誘起される乳頭細胞プロトプラスト内の Ca^{2+} 濃度上昇が完全に阻害されることが明らかとなった (Fig. 2-2)。以上の結果から、グルタミン酸受容体が自家受粉時における乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入に関与するチャンネル分子候補であることが示唆された。

AP-5 処理による自家不和合性の打破

前記実験において自家受粉時の乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入に関与することが示唆されたグルタミン酸受容体は、これまで主に動物の神経伝達系で機能する分子として研究が進められてきた (Traynelis et al., 2010)。AP-5 は、動物では Ca^{2+} に対して高い透過性を有する NMDA(N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体の競合阻害剤であり、そのリガンドと成り得る人工アミノ酸 NMDA のアナログである。これまでに、植物においても、AP-5 がアミノ酸処理によって誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を阻害する例も報告されており (Michael et al., 2011; Li et al., 2013)、植物細胞においても実績のある阻害剤である。そこで、もしこれら AP-5 感受性のグルタミン酸受容体が実際の自家不和合性反応に関与しているのであれば、AP-5 を予め柱頭に塗布した後に自家受粉すれば、乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入が阻害され、自家不和合性が打破される事が期待される。そこで、 S_b -SRK を発現させた *A. thaliana* C24 の柱頭に予め AP-5 水溶液を処理し、乾燥させた後に受粉試験を行った。和合性の野生型花粉を受粉させた場合、AP-5 処理の有無に関わらず、花粉管の柱頭内への伸長が観察された (Fig. 2-3A, B)。一方、不和合性の S_b -SP11 を発現させた花粉を受粉させた場合には、AP-5 処理により自家不和合性反応が打破され、花粉管が柱頭内へ伸長していく様子が観察された (Fig. 2-3C, D)。

以上の結果は、グルタミン酸受容体の阻害剤 AP-5 が、和合性の受粉には影響を及ぼさずに自家不和合性反応を特異的に打破することを示唆しており、何らかの AP-5 感受性グルタミン酸受容体が自家不和合性情報伝達経路の重要な鍵分子として機能していることを強く示唆した。

グルタミン酸受容体 RNAi 発現抑制株を用いた不和合反応の解析

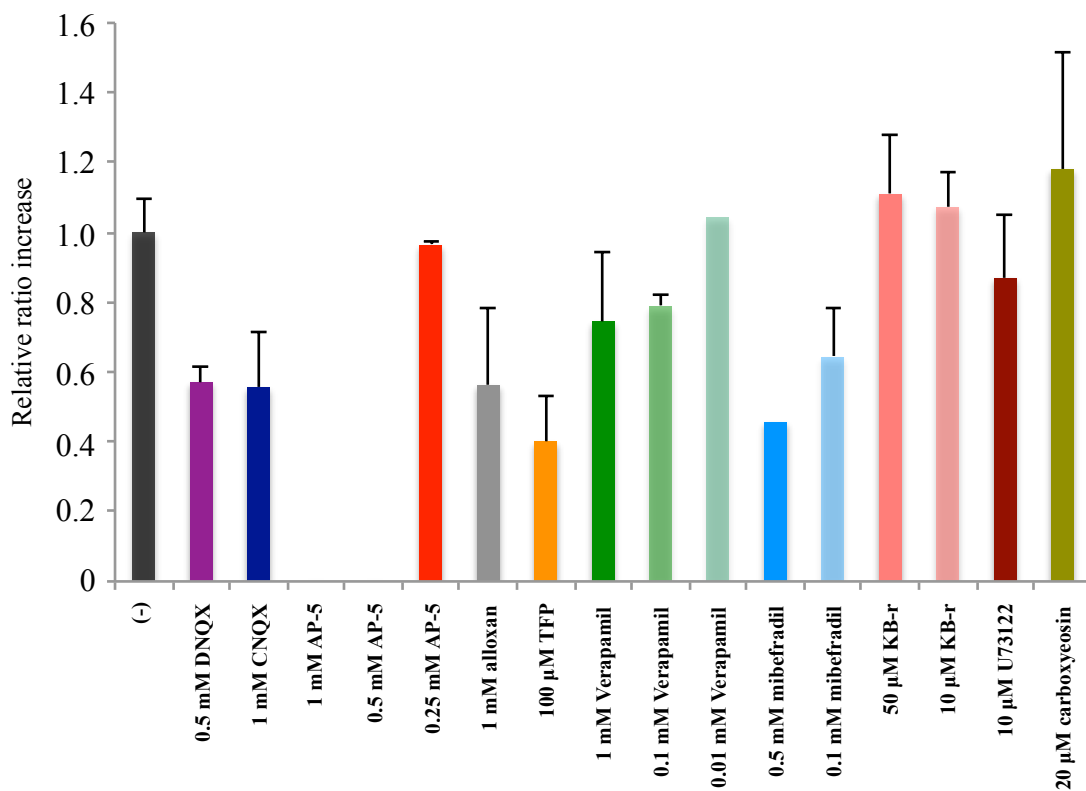


Fig. 2-2. 各種阻害剤の効果

YC3.60 と S_b -SRK を発現させたプロトプラストに各種阻害剤を処理し、 S_b -SP11 を添加した後のプロトプラスト全体の Ratio 値 (YFP/CFP) の上昇度 (“SP11 処理後最大の Ratio 値”-“SP11 処理前の Ratio 値”) を Control (-)に対する相対値で示した。

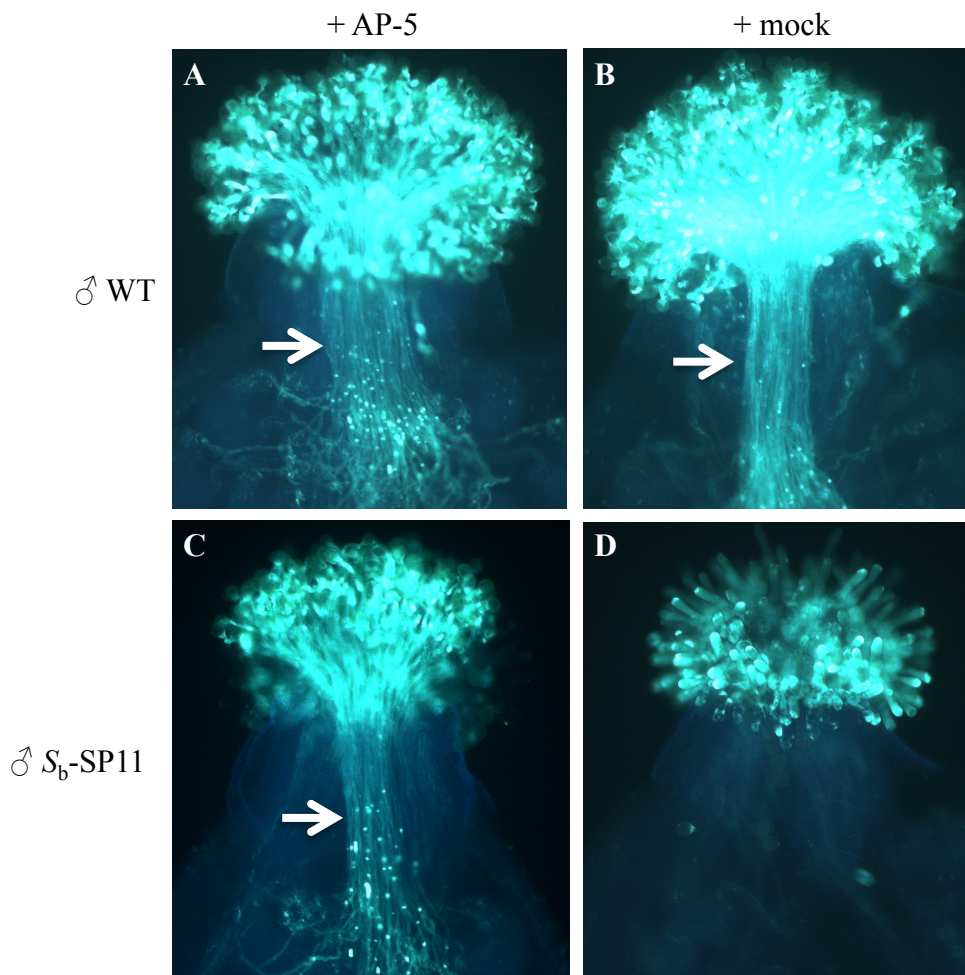


Fig. 2-3. AP-5 処理による自家不和合性の打破

(A-D) 柱頭側は、すべて S_b -SRK を発現させた *A. thaliana* を用いた。A. 柱頭に AP-5 を処理し、WT の花粉を受粉させたもの。B. 柱頭に 0.05% Tween20 を処理し、WT の花粉を受粉させたもの。C. 柱頭に AP-5 を処理し、 S_b -SP11 の花粉を受粉させたもの。D. 柱頭に 0.05% Tween20 を処理し、 S_b -SP11 の花粉を受粉させたもの。矢印は、柱頭内に侵入した花粉管を示している。

上記生理学・薬理的解析から、何らかのグルタミン酸受容体が自家不和合性反応時の乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入を誘起する Ca^{2+} 輸送体分子として機能していることが示唆された。そこで、実際の自家不和合性反応に関与する乳頭細胞内グルタミン酸受容体の分子種を特定することを目的として以下の実験を行った。

ゲノム解析によって、*A. thaliana* はグルタミン酸受容体の候補として 20 種類の分子種を保持することが示唆されている (Davenport, 2002) (Fig. 2-4)。当研究室で行われた、レーザーマイクロダイセクション-マイクロレイ法による乳頭細胞の網羅的トランスクリプトーム解析データをもとに (五十嵐, 2014)、乳頭細胞で特に強く発現している *GLR3.7* (At2g32400)、*GLR3.5* (At2g32390)、*GLR3.3* (At1g42540) の 3 分子種を候補として抽出した (Fig. 2-5)。さらに、自家受粉後 15 min で乳頭細胞内において発現誘導される *GLR1.3* (At5g48410) を 4 番目の候補として抽出した (Fig. 2-5)。これらの 4 候補遺伝子の乳頭細胞における発現を各々 RNAi 法により特異的に抑制することを計画し、各遺伝子に特異的な ORF 塩基配列をトリガーとして乳頭細胞で発現させる RNAi コンストラクトを作製し、*S_b-SRK* と YC3.60 を共発現する *A. thaliana* C24 株 (親株 M) にさらに遺伝子導入した。得られた形質転換体の種子を、新たに導入したハイグロマイシン耐性を指標に選抜したところ、*GLR3.3* RNAi 体を 12 株、*GLR3.7* RNAi 体を 3 株、*GLR1.3* RNAi 体を 4 株取得することに成功した。しかし、*GLR3.5* RNAi 体に関しては、同様に選抜を行ったが形質転換体を取得することはできなかった。得られた RNAi 体は定量的 RT-PCR 法により、各遺伝子の発現抑制の程度を計測した (Fig. 2-6A-C)。しかし、*GLR3.3* に関しては最も発現が抑制された RNAi 体 (*GLR3.3-6*) で親株の約 1/5、*GLR3.7* と *GLR1.3* に関しては、最も発現抑制された RNAi 体 (*GLR3.7-2* と *GLR1.3-2*) で親株の約 1/2 程度までの抑制しか認められなかった。また、いずれの RNAi 体も、自家不和合性反応に変化は認められなかった (Fig. 2-7)。さらに、これら RNAi 体から乳頭細胞プロトプラストを作製し、*S_b-SP11* 添加時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (YFP/CFP ratio) を計測したが、親株と差異は認められなかった (Fig. 2-8A-C)。

TILLING 法によるグルタミン酸受容体候補遺伝子変異株の取得と表現型解析

前述の RNAi 法による発現抑制実験では、十分に発現抑制された RNAi 体を取得することが出来ず、自家不和合性反応への関与を明らかにすることは出来なかった。そこで次に、当研究室において確立された *A. thaliana* C24 株由来の TILLING 用ライブラリーから (Lai et al., 2012)、上記 4 グルタミン酸受容体候補

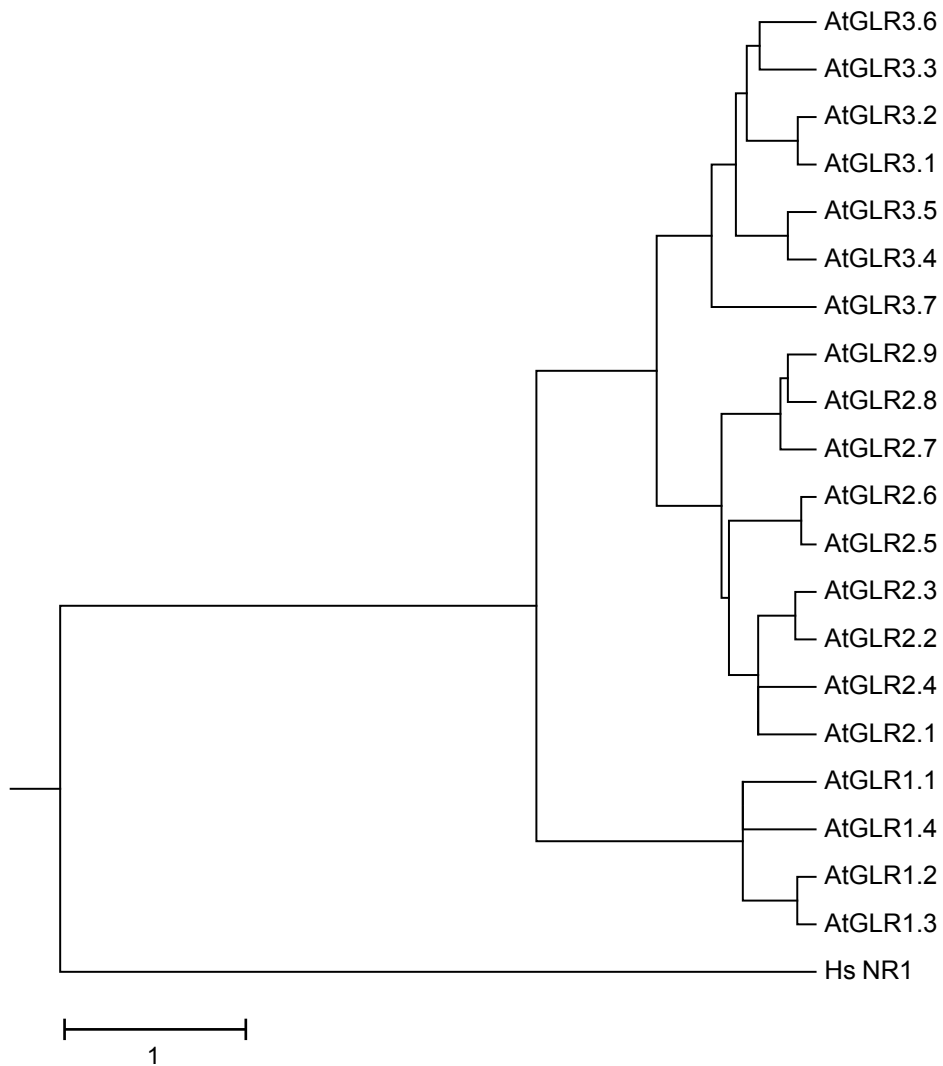


Fig. 2-4. *A. thaliana* グルタミン酸受容体の系統樹

A. thaliana において同定されている 20 種類のグルタミン酸受容体とヒトの NMDA 型グルタミン酸受容体 (Hs NR1)。

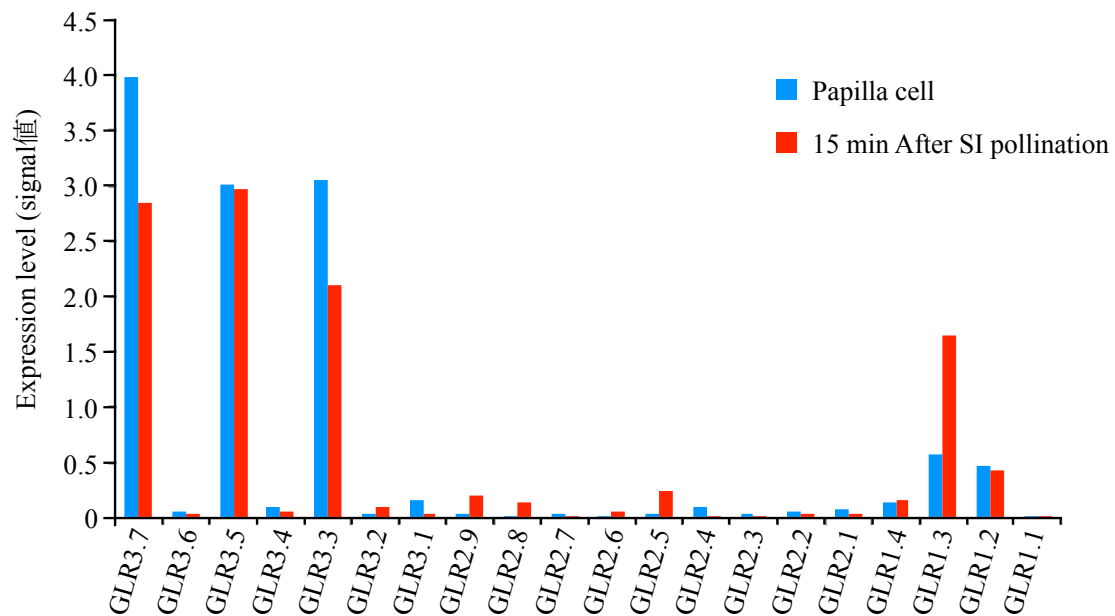


Fig. 2-5. 受粉前と不和合受粉 15 分後の乳頭細胞におけるグルタミン酸受容体遺伝子の発現比較

縦軸はシグナル値、横軸は遺伝子名を示す。棒グラフの青色は受粉前の乳頭細胞において発現しているグルタミン酸受容体の発現量、赤色は不和合受粉後 15 分の乳頭細胞において発現しているグルタミン酸受容体の発現量を示す。

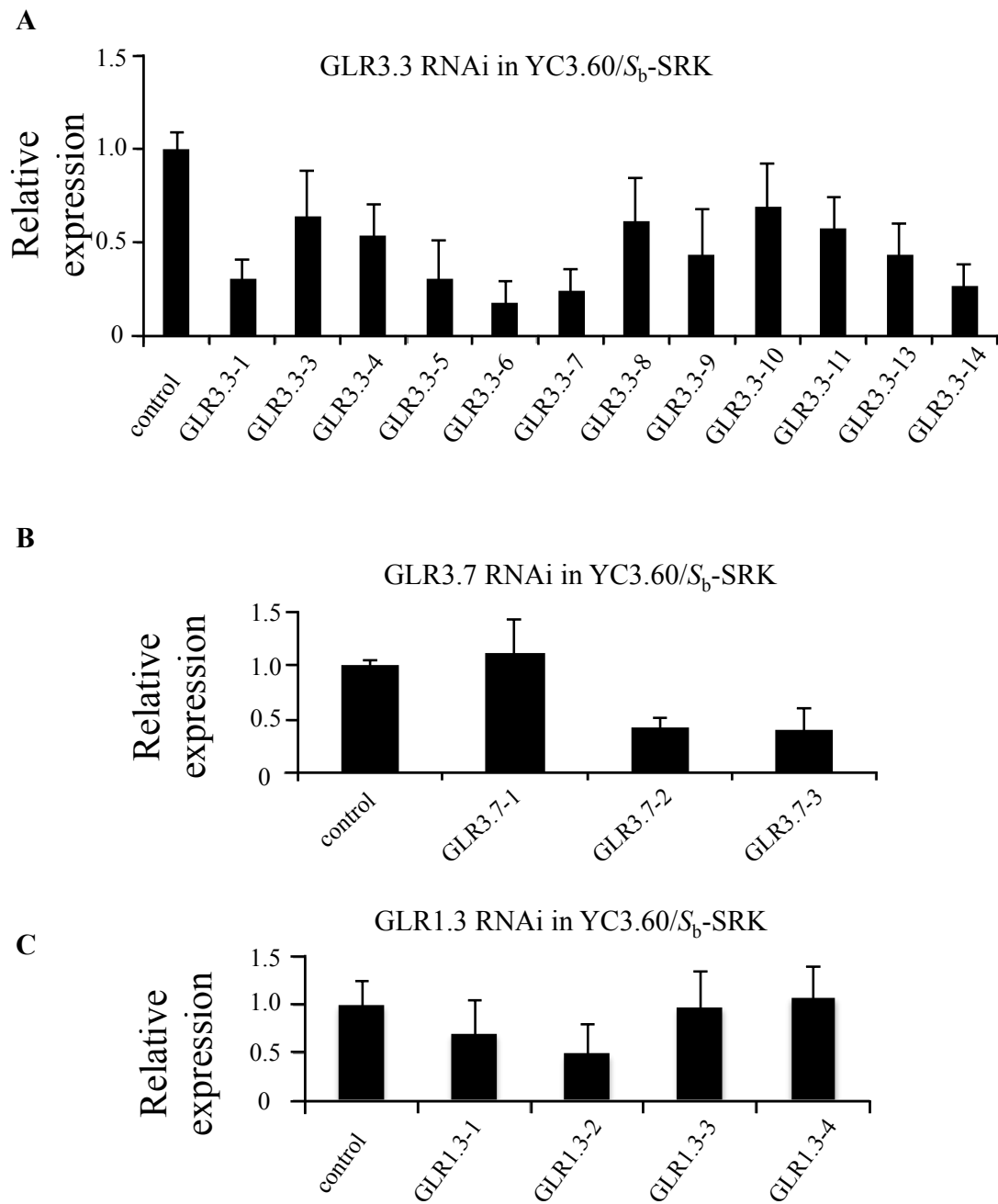


Fig. 2-6. 定量的 RT-PCR を用いた RNAi 抑制株の発現量解析

(A-C) 定量的リアルタイム PCR を用いて *GLR3.3*、*GLR3.7*、*GLR1.3* RNAi 抑制株の発現量解析を行った。内部標準は *GAPDH* を用いて定量をおこなった。A. *GLR3.3* RNAi 抑制株。B. *GLR3.7* RNAi 抑制株。C. *GLR1.3* RNAi 抑制株。各グラフの control は親株である非 RNAi 体を示す。

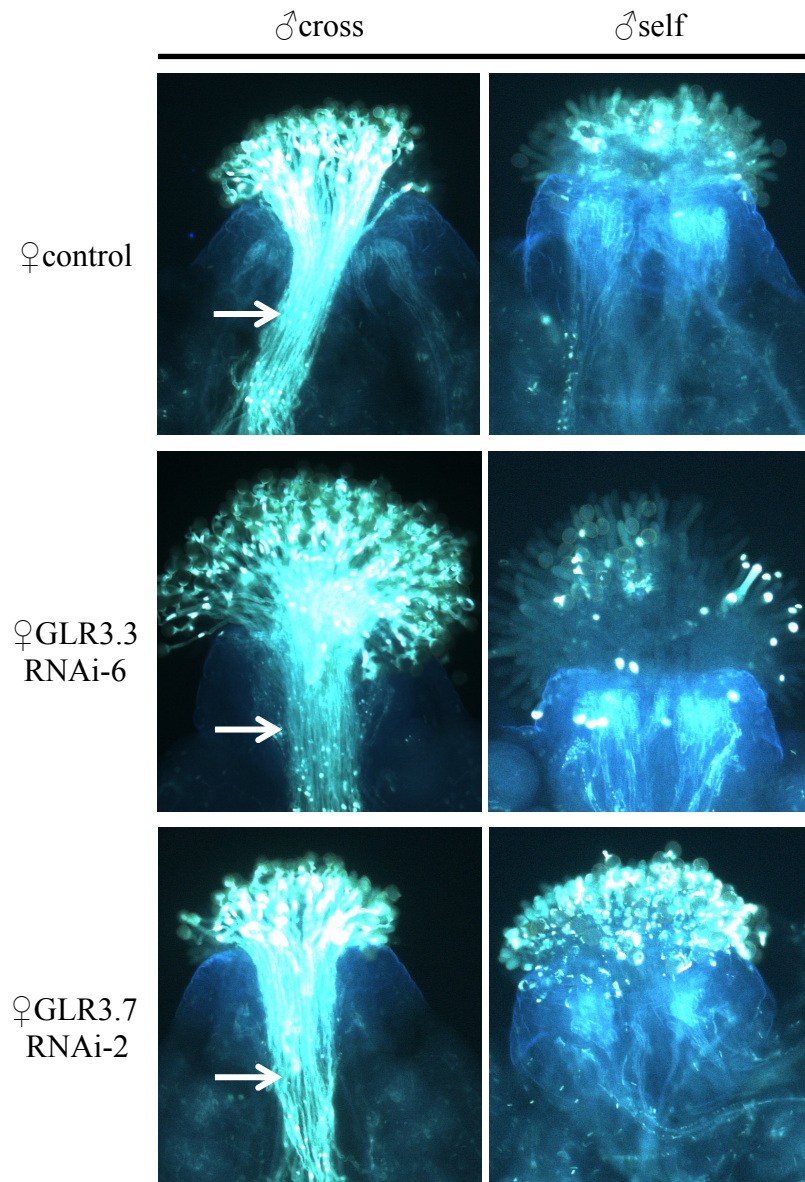


Fig. 2-7. RNAi 抑制株における花粉管伸長の観察

Control (親株)、GLR3.3 RNAi-6、GLR3.7 RNAi-2 形質転換体の柱頭に、cross (WT) と self (*S_b-SP11*) の花粉をそれぞれ受粉させた時のアニリンブルー写真。矢印は柱頭内へと侵入した花粉管を示す。

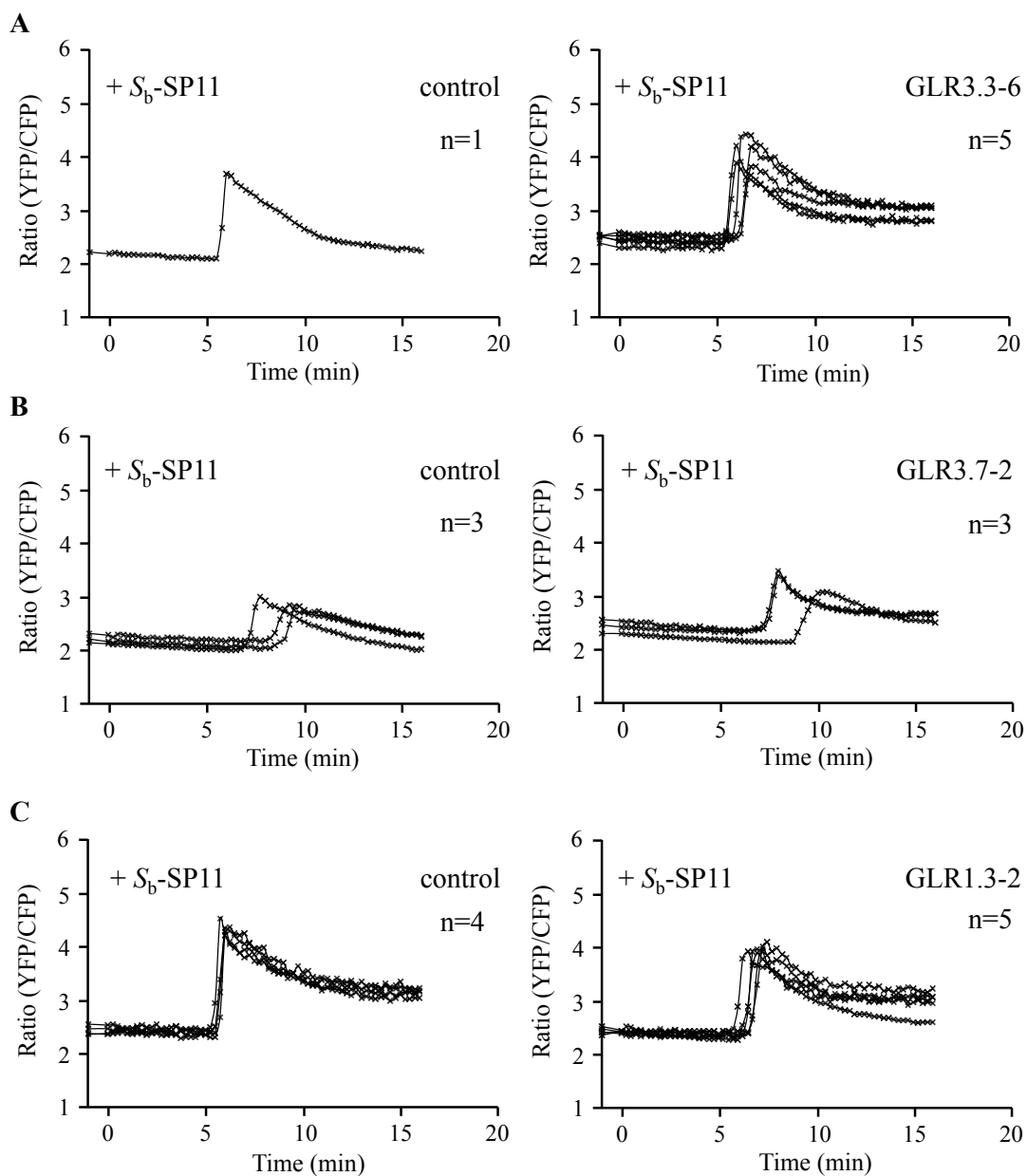


Fig. 2-8. RNAi 抑制株を用いた Ca^{2+} イメージング

(A-C) RNAi 抑制株から作製した乳頭細胞プロトプラストを用いて YFP/CFP ratio の経時変化を各々グラフにプロットした。各コンストラクトごとに形質転換体を選抜した時期が異なるため、各形質転換体と同時に播種し、同じ時期・環境条件で栽培した親株 (control) を比較対象として各々示した。A. GLR3.3-6 RNAi 株 (右図) と control (左図)。B. GLR3.7-2 RNAi 株 (右図) と control (左図)。C. GLR1.3-2 RNAi 株 (右図) と control (左図)。いずれも SP11 を加えた時点を 0 min とした。

遺伝子の点突然変異株をスクリーニングすることにした。探索の結果、エキソン領域に点変異を持つ株を、*GLR3.3* について 10 株 (Table 2-1)、*GLR3.5* について 18 株 (Table 2-2)、*GLR3.7* について 15 株 (Table 2-3)、*GLR1.3* について 22 株 (Table 2-4) 取得することに成功した。また、4 候補遺伝子の全てにおいて、アミノ酸コドンが終止コドンへと変化したナンセンス変異株を得ることが出来たため (Fig. 2-9A, B)、以降の解析はこれらナンセンス変異株を用いて進めることにした。なお、各遺伝子のナンセンス変異株を各々 *GLR3.3_W252X*、*GLR3.5_W462X*、*GLR3.7_W765X*、*GLR1.3_W491X* と以降表記することにする。

各々のナンセンス変異株に、交配によって *S_b-SRK* と *YC3.60* を導入した株を作製し、これらの植物体を使ってまず受粉時の表現型の変化の有無を解析した。和合性の野生株の花粉と、不和合性の *S_b-SP11* 発現花粉をこれらナンセンス変異株の柱頭に受粉させた後、花粉管の伸長をアニリンブルー染色により観察した。各ナンセンス変異株におけるアニリンブルー染色の結果は、変異を持たない野生株の雌ずいに、和合・不和合花粉を受粉させた時と同様の表現型を示し、花粉の吸水阻害等の自家不和合性反応に変化は見られなかった (Fig. 2-10A-D)。次に各々のナンセンス変異株から乳頭細胞プロトプラストを調製し、*S_b-SP11* 処理時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 (*S_b-SP11* 処理前後の YFP/CFP ratio の差) を、野生株の場合と比較検討した。その結果、*GLR1.3_W491X* と *GLR3.3_W252X* 両ナンセンス変異株では、野生株と比較して Ca^{2+} 濃度の上昇に差は認められなかったが (Fig. 2-11A, B)、*GLR3.5_W462X* と *GLR3.7_W765X* 両ナンセンス変異株においては、*S_b-SP11* 処理時に誘導される乳頭細胞プロトプラスト内の Ca^{2+} 濃度上昇が有意に減少することが示された (Fig. 2-11C, D)。以上の結果は、乳頭細胞で最も高発現である *GLR3.7* と *GLR3.5* の少なくとも 2 分子種を含むグルタミン酸受容体メンバーが自家不和合反応時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関与していることを示唆した。

GLR3.7 の相補試験における不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇の回復

TILLING 法により得られた変異株は、検出している遺伝子上の変異以外にも複数の点突然変異を含むため、野生型の遺伝子を導入して表現型の回復を確認する相補試験が必要である。そこで、乳頭細胞において最も高発現であり、且つ不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇が有意に減少していた *GLR3.7_W765X* ナンセンス変異株を用いて相補試験を行った。*GLR3.7cDNA* を自身のプロモーター下に繋いだ相補試験用のコンストラクト *GLR3.7p:GLR3.7/pcambia* を、*S_b-SRK* と

Table 2-1. TILLING により取得した *GLR3.3* 点突然変異株

<i>GLR3.3</i>				
No.	Position form ATG	Amino acid change	Homo/ Hetero	Mutation type
1	G44A	S15N	Homo	Missense
2	G47A	G16E	Hetero	Missense
3	T205C	S69P	Hetero	Missense
4	G638A	D183N	Hetero	Missense
5	G677A	A196T	Hetero	Missense
6	G847A	W252X	Hetero	Nonsense
7	G856A	-	Homo	Sense
8	T940C	-	Homo	Sense
9	C989T	R300C	Hetero	Missense
10	T1000C	-	Hetero	Sense

Table 2-2. TILLING により取得した *GLR3.5* 点突然変異株

<i>GLR3.5</i>				
No.	Position form ATG	Amino acid change	Homo/ Hetero	Mutation type
1	C197T	A66V	Hetero	Missense
2	G233A	R78K	Hetero	Missense
3	G510A	-	Homo	Sense
4	G520A	E105K	Homo	Missense
5	G559A	G118R	Hetero	Missense
6	C579T	-	Hetero	Sense
7	G633A	-	Hetero	Sense
8	C646T	L147F	Hetero	Missense
9	C705T	-	Homo	Sense
10	C825T	-	Homo	Sense
11	C887T	S227F	Homo	Missense
12	G973A	G256R	Homo	Missense
13	C1372T	L389F	Homo	Missense
14	G1593A	W462X	Hetero	Nonsense
15	G1598A	G464E	Hetero	Missense
16	G1660A	G485R	Hetero	Missense
17	C1775T	P523L	Homo	Missense
18	G1959A	G557E	Hetero	Missense

Table 2-3. TILLING により取得した *GLR3.7* 点突然変異株

<i>GLR3.7</i>				
No.	Position form ATG	Amino acid change	Homo/Hetero	Mutation type
1	G834A	E172G	Hetero	Missense
2	G842A	E165K	Hetero	Missense
3	C684T	S112P	Hetero	Missense
4	G2077A	D536N	Homo	Missense
5	G1520A	E391K	Homo	Missense
6	C1845T	P499L	Homo	Missense
7	C1856T	P503S	Homo	Missense
8	C1910T	L521F	Homo	Missense
9	G2170A	D567N	Homo	Missense
10	C3420T	R873W	Hetero	Missense
11	C3123T	-	Homo	Sense
12	G3022A	W765X	Homo & Hetero	Nonsense
13	G2942A	P774S	Homo	Missense
14	C2751T	T675I	Homo	Missense
15	G2903A	G726R	Homo & Hetero	Missense

Table 2-4. TILLING により取得した *GLR1.3* 点突然変異株

<i>GLR1.3</i>				
No.	Position form ATG	Amino acid change	Homo/Hetero	Mutation type
1	A160G	K54E	Homo	Missense
2	G460A	G123E	Homo	Missense
3	G461A	-	Hetero	Sense
4	G469A	G126E	Hetero	Missense
5	C589T	S166F	Homo & Hetero	Missense
6	C622T	A177V	Hetero	Missense
7	G633A	E181K	Homo	Missense
8	C678T	H196Y	Homo	Missense
9	G852A	G254R	Homo	Missense
10	C886T	T265I	Hetero	Missense
11	G912A	E274K	Hetero	Missens
12	C1061T	-	Hetero	Sense
13	G1151A	-	Hetero	Sense
14	G1230A	E380K	Homo	Missense
15	C1371T	P427S	Homo	Missense
16	G1414A	R441K	Hetero	Missense
17	G1551A	E487K	Hetero	Missense
18	C1560T	P490S	Homo	Missense
19	G1565A	W491X	Hetero	Nonsense
20	C1590T	L500F	Homo	Missense
21	G1804A	V544I	Homo	Missense
22	C1945T	P591S	Homo	Missense

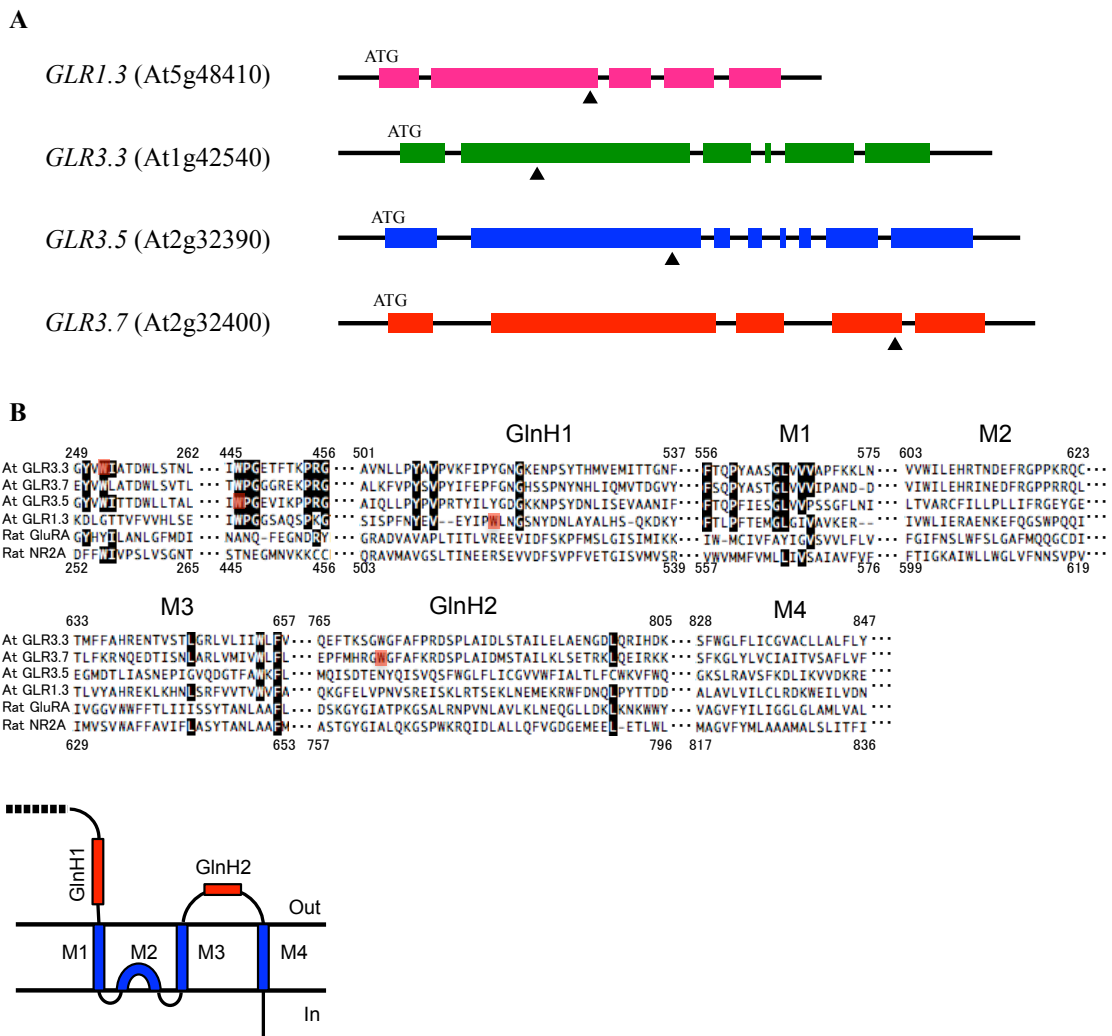


Fig. 2-9. グルタミン酸受容体ナンセンス変異株の変異箇所

A. *GLR1.3*、*GLR3.3*、*GLR3.5*、*GLR3.7* 遺伝子上でナンセンス変異の入った箇所を示す (▲)。

B. 動物のイオンチャネル型グルタミン酸受容体とのアミノ酸配列から予測される変異箇所と動物において推定されているイオンチャネル型グルタミン酸受容体の構造。動物のグルタミン酸受容体としてラットの AMPA 型グルタミン酸受容体 GluRA と NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2A のアミノ酸配列を用いた。*A. thaliana* ナンセンス変異株において変異の入った箇所を赤色で示し、保存されているアミノ酸を黒色で示した。リガンド結合部位 : (GlnH1、GlnH2)、膜貫通領域 : (M1~M4)、ポア領域 : M2。

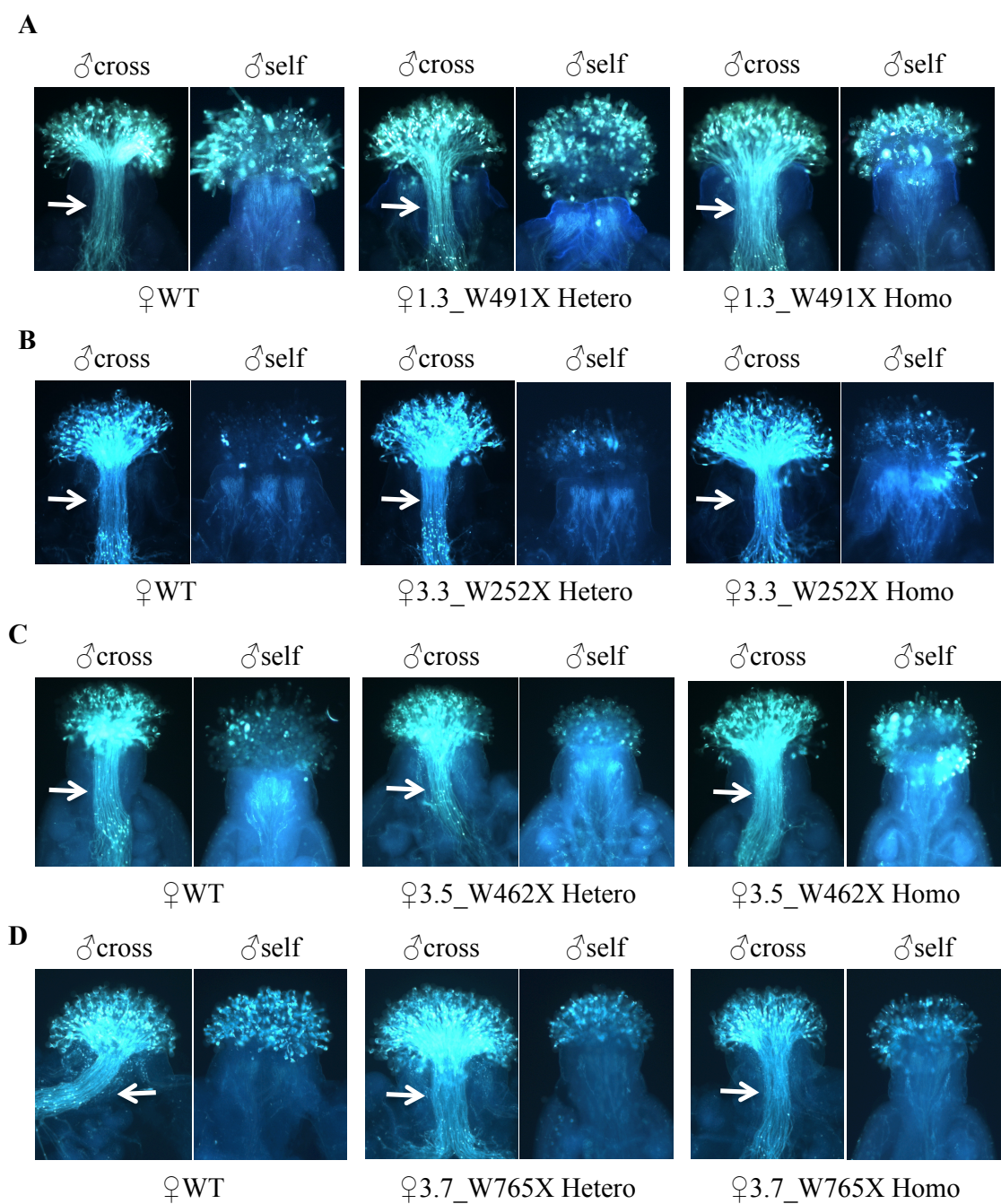


Fig. 2-10. 各ナンセンス変異株における花粉管伸長の観察

(A-B) ナンセンス変異を WT、Hetero、Homo に持つ株の雌ずに cross (WT) と self (S_b -SP11) の花粉を受粉させた時のアニリンブルー写真。矢印は柱頭内に侵入した花粉管を示す。A. GLR1.3_W491X 株を用いた解析結果。B. GLR3.3_W252X 株を用いた解析結果。C. GLR3.5_W462X 株を用いた解析結果。D. GLR3.7_W765X 株を用いた解析結果。

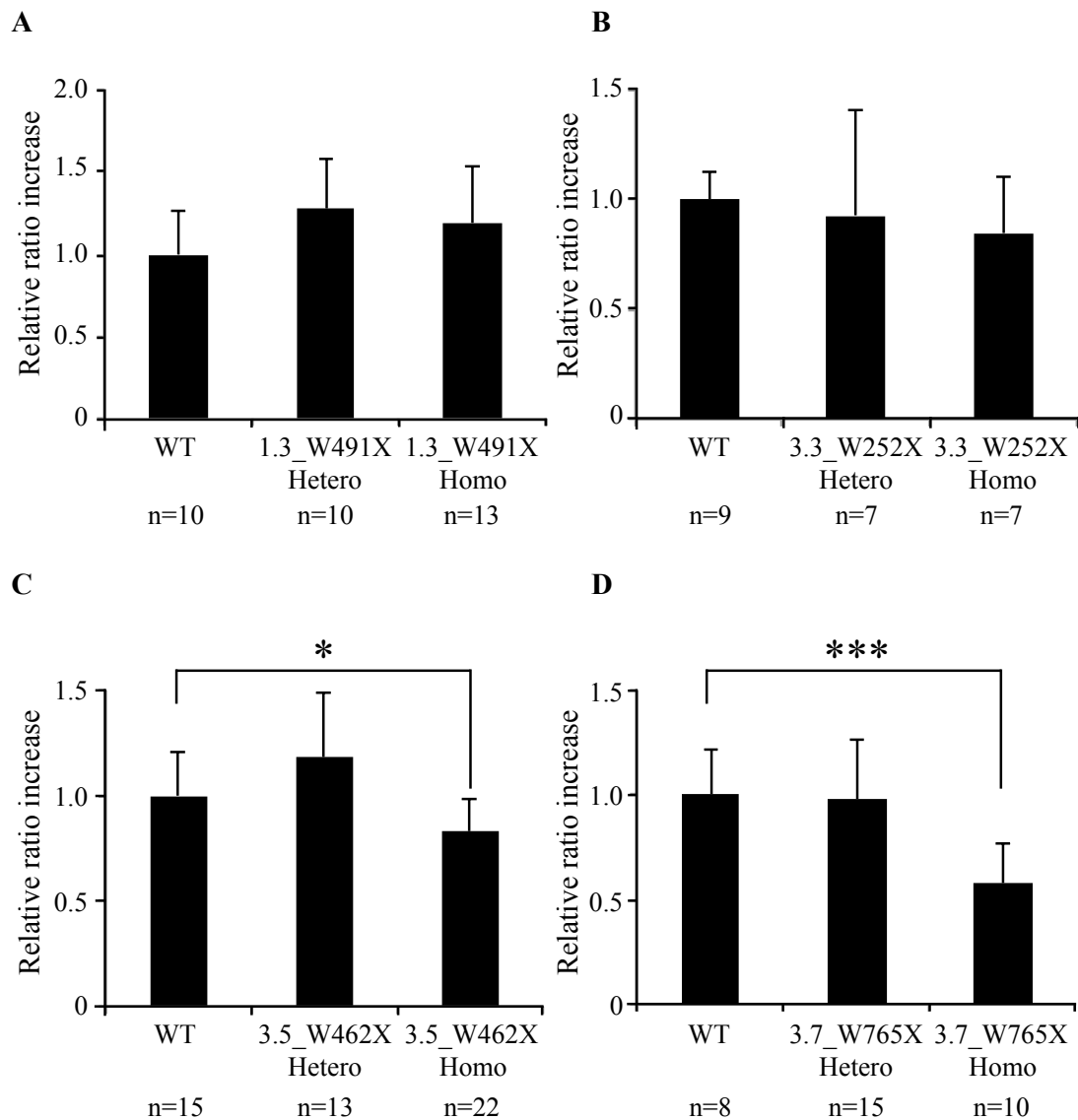


Fig. 2-11. 各ナンセンス変異株における S_b -SP11 処理後の Ca^{2+} 濃度上昇の解析

(A-D) ナンセンス変異株を WT、Hetero、Homo に持つ株の乳頭細胞から作製したプロトプラストを用いた Ca^{2+} イメージング実験。作製したプロトプラストに S_b -SP11 を添加した後のプロトプラスト全体の Ratio 値 (YFP/CFP) の上昇度を、WT に対する相対値で示したもの。(mean \pm S.D.; t-test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with WT)。**A.** GLR1.3_W491X を用いた解析結果。**B.** GLR3.3_W252X を用いた解析結果。**C.** GLR3.5_W462X を用いた解析結果。**D.** GLR3.7_W765X を用いた解析結果。

YC3.60 の両遺伝子を持つ GLR3.7_W765X ナンセンス変異株へ遺伝子導入し、形質転換体を 8 個体取得した (Fig. 2-12A)。この 8 個体のうち、*S_b-SRK* と YC3.60 の両方を持つ 6 個体について乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca²⁺イメージング実験を行った。その結果、相補試験を行った 6 個体中 2 個体において、不和合反応時に誘導される乳頭細胞プロトプラスト内 Ca²⁺濃度上昇が野生株と同程度にまで回復していることが観察された (Fig. 2-12B)。以上の結果から、GLR3.7 が不和合反応時の乳頭細胞内への Ca²⁺流入に関わる Ca²⁺チャネル分子の一つであることがより強く示唆された。

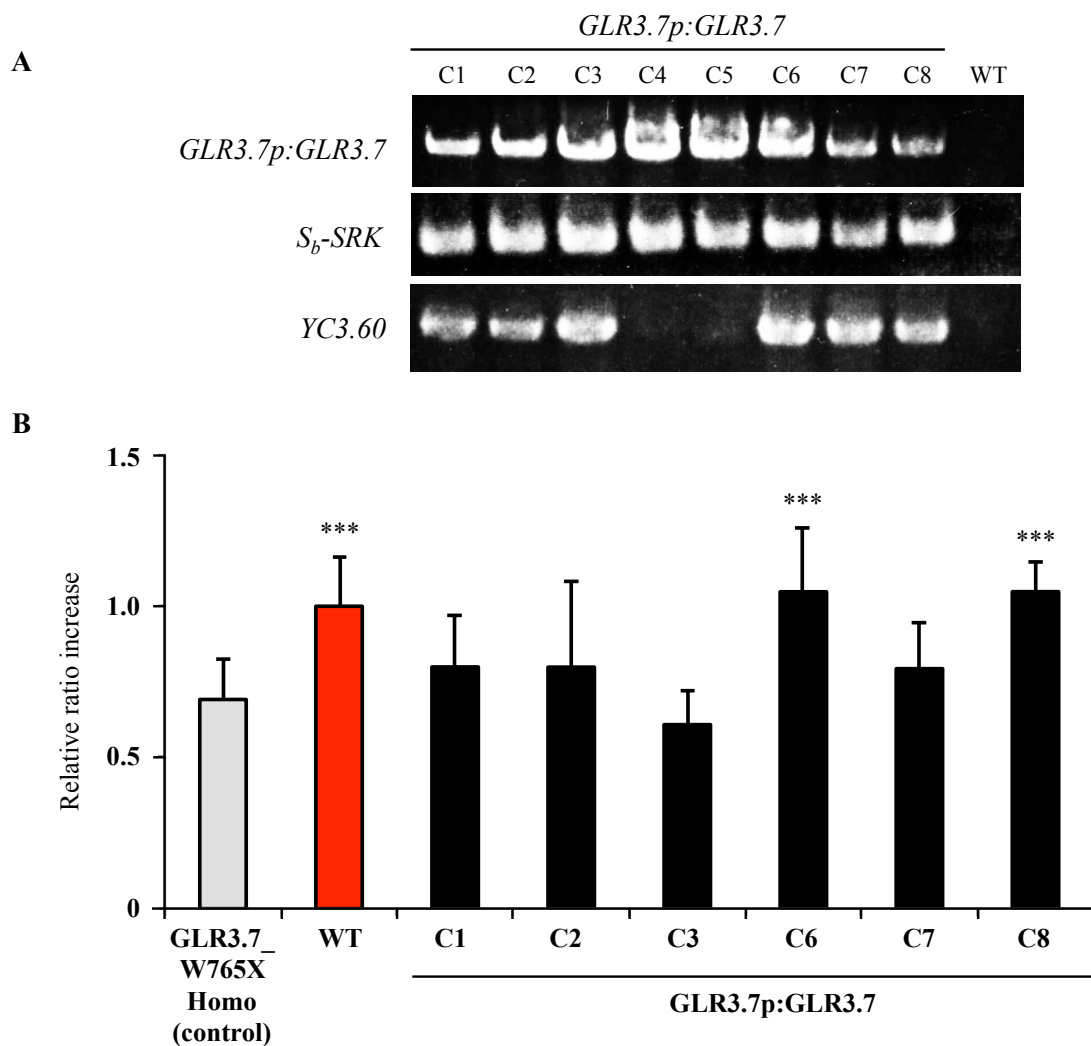


Fig. 2-12. *GLR3.7p:GLR3.7* 形質転換体におけるコンストラクトの導入確認と Ca^{2+} イメージングによる表現型回復実験

A. ハイグロマイシンを用いた薬剤選抜により得た 8 個体 (C1~C8) における *GLR3.7p:GLR3.7*、*S_b-SRK*、*YC3.60* それぞれの genotyping 結果。**B.** *GLR3.7_W765X* homo (control) 、WT、遺伝子の導入が確認された 6 個体の形質転換体由来の乳頭細胞プロトプラストを用いた Ca^{2+} イメージング実験。作製したプロトプラストに *S_b-SP11* を添加した後のプロトプラスト全体の Ratio 値 (YFP/CFP) の上昇度を、WT に対する相対値で示したもの。(mean ± S.D.; t-test, *** P < 0.001 compared with control)

2-4 考察

本章における阻害剤を用いた生理・薬理的解析から、不和合反応時に見られる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には、乳頭細胞の細胞膜上に存在するグルタミン酸受容体 (GLR) が関与することが明らかになった。さらに、グルタミン酸受容体遺伝子のナンセンス変異株を取得し、これら変異株を用いた Ca^{2+} イメージングの解析と *GLR3.7* における相補試験の結果から、*GLR3.5* と *GLR3.7* を含むグルタミン酸受容体が、自家受粉時に乳頭細胞内へと Ca^{2+} を流入させる Ca^{2+} 輸送体分子である可能性が強く示唆された。

本章では、乳頭細胞プロトプラストを用いた実験により、*GLR3.7*、*GLR3.5* の両ナンセンス変異株において、不和合反応時に誘起される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が野生株と比較して有意に減少する事、また、ナンセンス変異株において減少した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が *GLR3.7* の相補試験により回復することが示された。これらの結果は、*GLR3.7* と *GLR3.5* を含むグルタミン酸受容体が、不和合反応時において、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に関わるイオンチャネルの実体である可能性を強く示唆するものである。

しかし、*GLR3.5* と *GLR3.7* のナンセンス変異株においては、不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇が抑えられていたが、期待した自家不和合性反応の打破といった表現型は示さなかった。この原因としては、グルタミン酸受容体が形成する受容体ファミリーの冗長性によることが推測される。*A. thaliana* が形成するグルタミン酸受容体ファミリーは、アミノ酸配列の相同性が 28%~80% と非常に類似している。さらに、傷害応答時に関与することが報告されている *GLR3.3* と *GLR3.6* は、それぞれの単独変異体においては、部分的な表現型しか示さないが、二重変異体ではより強い表現型が観察されることから (Mousavi et al., 2013)、グルタミン酸受容体はファミリー内の幾つかの分子が冗長的に機能していることが推定される。従って、*GLR3.7* と *GLR3.5* の二重変異体を作製すれば、これらの分子と不和合反応との関係が明確になる事が期待される。しかし、これら二つの遺伝子はゲノム上で *GLR3.7* の終止コドンから *GLR3.5* の開始コドンまでの距離が 756 bp という近さで隣接しており、組換えによる二重変異体の作製は困難であると思われる。RNAi による発現抑制の系も本研究では上手く機能しなかったが、近年、ZFNs (zinc finger nucleases) や TALENs (transcription activator-like effector nucleases) などの人工ヌクレアーゼを使ったノックアウト実験技術も開発されてきている (Joung and Sander, 2012)。*A. thaliana* においても TALEN を利用した変異導入が行われており (Christian et al., 2013)、今後はこれらゲノム編

集の実験手法を利用することで、GLR3.7 と GLR3.5 の自家不和合性への関与を直接証明することができるものと期待される。

動物のグルタミン酸受容体は中枢神経系に広く分布し、神経伝達において重要な機能を果たしていることが示されており (Watkins and Jane, 2006)、大きく分けてイオンチャネル型受容体と代謝型受容体の2つに分類されている。代謝型受容体はそれ自体がイオンチャネルとしての機能を持たない、Gタンパク質共役型受容体である (Julio-Pieper et al., 2011)。一方のイオンチャネル型受容体は、アミノ酸を受容した受容体自体がイオンチャネルとして機能する。このイオンチャネル型グルタミン酸受容体は、さらに、AMPA型、NMDA型、KA (kainic acid) 型の3つに分類される (Meldrum, 2000)。AMPA型は、人工アミノ酸である AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) を特異的に受容することから命名され、リガンドとしてグルタミン酸を受容することで、ポア領域が開口し、イオンチャネルとして機能する。KA型はAMPA型とは異なり、カイニン酸に強い親和性を有するが、AMPA型と同様の作用機序を示す。一方、NMDA型は、人工アミノ酸NMDAを特異的に受容することから命名され、AMPA型とは異なった活性機構を示す。NMDA型は、リガンドとしてグルタミン酸を受容しただけでは機能せず、グリシンの結合が必要とされる。さらに、活性化する前のNMDA型のポア領域は Mg^{2+} により塞がれており、近くの細胞膜上に局在するAMPA型の受容体が活性化して膜を脱分極させることで Mg^{2+} が外れ、イオンを透過させることが示されている。

また、これらのグルタミン酸受容体は、 Na^+ や K^+ 、 Ca^{2+} などの陽イオンを透過させることが報告されているが、特にNMDA型のグルタミン酸受容体は Ca^{2+} に対して高い透過性を有することが明らかとなっている (Mayer et al., 1987)。

これまでに *A. thaliana* において同定されているグルタミン酸受容体は、アミノ酸配列の相同性から動物のグルタミン酸受容体と同様の構造をしていると推定されており (Lam et al., 1998; Davenport, 2002)、実際に、AMPA型やNMDA型それぞれのアンタゴニストが植物細胞においても作用する例も存在する (Walch-Liu and Forde, 2007; Li et al., 2013)。また、*A. thaliana* のGLR3.3は、動物のNMDA型受容体と同様にグリシンとグルタミン酸に反応し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘起することから (Qi et al., 2006)、動物のグルタミン酸受容体と類似した点を示唆されている。その一方で、植物細胞にアゴニストであるNMDAやAMPAを処理しても反応がみられないことなどから (Kwaaitaal et al., 2012)、植物におけるグルタミン酸受容体がAMPA型やNMDA型などのタイプに分類されるかどうかについては未だ不明である。

本章における生理・薬理的解析では、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である AP-5 を処理した際にのみ、不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇が完全に抑制され、受粉試験においては自家不和合性が打破されることが明らかとなった。これらの結果は、アブラナ科植物における Ca^{2+} を介した自家不和合情報伝達系においてグルタミン酸受容体が関与していることを強く示唆するとともに、NMDA が拮抗的に作用しうるリガンドを介して活性化する NMDA 型様のグルタミン酸受容体の存在を示唆するものであると考えられる。

これまでに、*A. thaliana* のグルタミン酸受容体においてリガンド依存的なイオンチャンネルとして同定されているものは、*GLR3.4* と *GLR1.4* の 2 つのみである。*AtGLR3.4* は、ヒト培養細胞 HEK293 を用いたパッチクランプの実験により、アスパラギン、セリン、グリシンをリガンドとする Ca^{2+} 透過型のイオンチャンネルであることが明らかとなっている (Vincill et al., 2012)。また、*AtGLR1.4* は、アフリカツメガエルの卵母細胞における発現系を用いた解析により、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、ロイシン、チロシン、アスパラギン、スレオニンの 7 種類のアミノ酸に反応する、リガンド依存的なイオンチャンネルであることが示唆されている (Tapken et al., 2013)。

本研究結果において、不和合反応時に機能する Ca^{2+} 輸送体であることが期待される *GLR3.7* は、電気生理学的な実験から Ca^{2+} を透過させるイオンチャンネルとして機能していることが示唆されているが、リガンド依存的であるかどうかに関しては述べられていない (Roy et al., 2008)。本研究では、リガンド分子の探索は行っていないが、先述した阻害剤の実験結果から、不和合反応時に機能するグルタミン酸受容体を活性化するための何らかのリガンド分子の存在が推察される。今後は、どのような分子が本反応を誘起するイオンチャンネル分子を活性化するのかを、本研究において確立した乳頭細胞プロトプラストを用いて、アミノ酸の網羅的な処理によるリガンド分子の探索や電気生理学的実験系の構築を行うことにより検証する必要があると考えられる。

本研究において不和合反応時に機能することが示唆された *GLR3.7* を含むグルタミン酸受容体が、花粉管の伸長に関与するということを Michard ら (2011) が報告している。*GLR3.7* の T-DNA 挿入株では、*in vitro* で花粉管を伸長させると、伸長速度が野生株と比べて遅くなり、花粉側の稔性低下による種子数の減少という表現型が観察されている。しかし、筆者が行った *GLR3.7* ナンセンス変異株の表現型解析では稔性に関する表現型は認められておらず (data not shown)、花粉管伸長への関与に関しては再検討が必要であると思われる。また、花粉管

の伸長時の Ca^{2+} オシレーションを誘起するグルタミン酸受容体のリガンドとしては、柱頭に存在するラセマーゼにより生合成される D-serine が示唆されている。GLR3.7 と D-serine との直接的な関係は未だ示されていないが、花粉側と同じ GLR3.7 を発現している乳頭細胞において和合受粉時に顕著な Ca^{2+} 流入が起こらないことから、GLR3.7 には D-serine 以外の別のリガンド分子が関与している可能性や、リガンドの結合のみでない複雑な調節系が本受容体の活性化に関与していることが示唆される。

動物の神経細胞におけるグルタミン酸受容体の活性化は、エキソサイトーシスによりグルタミン酸が細胞外液へと放出され、細胞膜上に存在する受容体の細胞外に存在するリガンド結合部位へと結合することによって誘導されることが明らかとなっている。また、*A. thaliana* におけるグルタミン酸受容体も、動物と同様、細胞外にリガンド結合部位が存在すると推定されており (Lam et al., 1998; Dubos et al., 2003)、さらに、植物においても類似した経路でグルタミン酸受容体が活性化する例が報告されている。タバコ細胞を用いた防御応答の研究において、卵菌由来のエリシターであるクリプトゲインによって誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇にはグルタミン酸受容体が関与していることが示唆されており、この時のグルタミン酸受容体の活性化はエキソサイトーシスによる細胞内からアポプラストへのグルタミン酸の放出によるものであることが、培地中のグルタミン酸量の直接定量によって、示唆されている (Vasta et al., 2011)。自家不和合反応時におけるグルタミン酸受容体の活性化にも、エキソサイトーシスによる物質分泌が関与しているかどうかは不明だが、SRK からグルタミン酸受容体の活性化に至るメカニズムの可能性の一つとして、今後検証していく必要があると考えられる。

また、動物のグルタミン酸受容体は、リン酸化によりチャネル活性の制御を受けていることも報告されている。マウスの海馬神経において NMDA 型グルタミン酸受容体は、PKA (Protein Kinase A) によってリン酸化され、 Ca^{2+} 流入が促進されることが示されている (Skeberdis et al., 2006)。*A. thaliana* のグルタミン酸受容体のリン酸化についての報告は未だ成されておらず、リン酸化と Ca^{2+} チャネル活性との関係は不明である。しかし、SRK の自己リン酸化の下流で SRK が直接的または間接的にグルタミン酸受容体のリン酸化を引き起こすことでチャネルの Ca^{2+} 透過性を調節している可能性も考えられるため、不和合反応時におけるグルタミン酸受容体のリン酸化の有無を検証することも重要であると考えている。

ケシ科における自家不和合性では、不和合反応時に大量の Ca^{2+} が花粉側へと

流入し、その直後に花粉管内のアクチン骨格が崩壊することがこれまでに明らかとなっている (Bosch and Franklin-Tong, 2008)。当研究室においても、不和合受粉時の *B. rapa* の乳頭細胞内ではアクチン繊維が崩壊することが示されている (Iwano et al., 2007)。アクチン骨格系は小胞輸送時のレールとして機能することが示唆されていることから、これらの骨格系の崩壊により小胞輸送系が上手く機能しなくなることが推察される。実際、和合受粉時の乳頭細胞内では、和合受粉に必要であることが予想される何らかの物質が小胞輸送される様子が観察されているが、不和合受粉時にはそれが起こらなくなることが Safavian らにより報告されている (Safavian and Goring, 2013)。アブラナ科植物においてもケシ科と同様に、 Ca^{2+} 流入の後にアクチン繊維の崩壊が起こるかどうかなについては未だ明らかとされていないが、不和合反応時に誘起される Ca^{2+} 流入がアクチン骨格の崩壊を誘導し、小胞輸送が起こらなくなることによって自己花粉の拒絶を引き起こしているのかもしれない。

本研究とこれまでに得られている知見を元に、考えられる新規の自家不和合性分子モデル図を示す (Fig. 2-13)。本仮説では、自家受粉時に SP11 を受容して活性化した SRK-MLPK 受容体複合体がリン酸化またはアゴニストの分泌など何らかの機構を介してグルタミン酸受容体を活性化し、乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入を誘起する。その後、アクチン骨格の崩壊、小胞輸送の阻害により、自己花粉を拒絶するという経路を考えている。今後は、未だ明らかとなっていない自家不和合反応時におけるグルタミン酸受容体の活性化機構、ならびに、自己花粉の拒絶に至る Ca^{2+} の下流情報伝達機構を明確にすること、さらには本論文において確立した乳頭細胞プロトプラストを用いた電気生理学的実験系の構築を進めていくことがアブラナ科植物自家不和合性情報伝達系を理解するための重要な課題である。

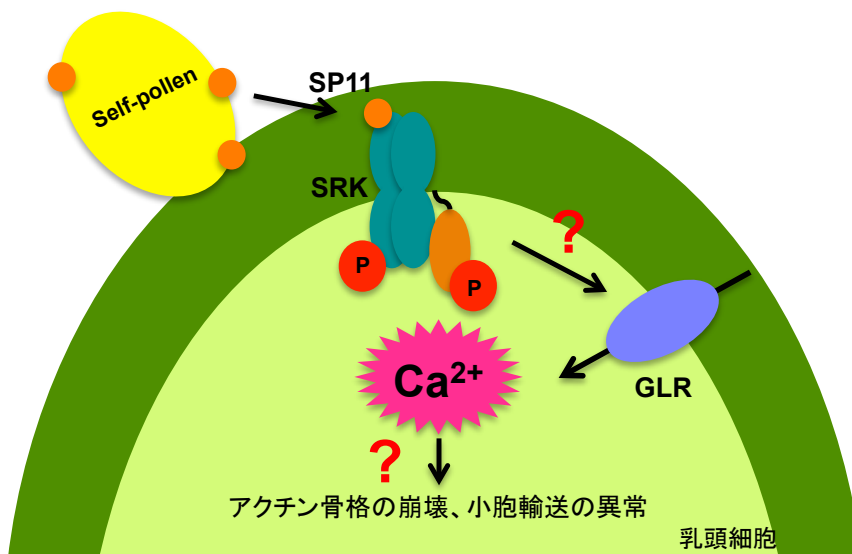


Fig. 2-13. アブラナ科植物自家不和合情報伝達系の新規モデル図

SP11 を受容した SRK が活性化後、何らかの機構によりグルタミン酸受容体が活性化し、乳頭細胞内へと Ca^{2+} の流入が誘導される。 Ca^{2+} 流入が誘起された後、アクチン骨格の崩壊、小胞輸送が起こらなくなることで自己花粉の拒絶に至る。

総括

被子植物における自家不和合性は、ダーウィンの時代から知られる植物特有の現象である。自家不和合性は、種の存続を支える遺伝的多様性の維持だけでなく、育種学的にも F1 ハイブリッド育種を行う上で重要な農業形質であることが知られている。この自己と非自己を識別し、自己の花粉を特異的に排除するメカニズムは、多くの研究者の興味を惹くものであり、今日までに数多くの研究が行われてきている。これまでに、自他識別に関わる分子についてはいくつかの系において同定されているが、自己排除に至るまでの情報伝達系の全容は未だ解明されていない。

アブラナ科植物は、花粉表層の花粉因子 SP11 と乳頭細胞膜上の雌ずい因子 SRK の S ハプロタイプ特異的な相互作用を介して自他識別が行われていることが示された数少ない系であるが、どの様にして自己の花粉の発芽・伸長を阻害しているのかは未解明のままであった。本研究は、SP11 と SRK の相互作用から花粉の発芽・伸長阻害に至るまでの下流情報伝達機構の解明を目指して、自家受粉時特異的に認められる乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に着目し、その生理的意義と Ca^{2+} 濃度上昇を誘起する分子の実体を明らかにすることを目的として行った。

これまでの実験系では、乳頭細胞におけるクチクラ層やワックス層の存在が障壁となり、自家受粉時に認められる乳頭細胞内の生理変化が SP11 によって直接惹起されているかどうかを確認することができなかった。そこで、筆者は、まず自家不和合性を付与した *A. thaliana* の乳頭細胞からプロトプラストを調製する方法を独自に確立し、S ハプロタイプ特異的な SP11-SRK 相互作用の下流で、乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が直接的に誘起されることを初めて明らかにした。また、この結果は、作製した乳頭細胞プロトプラストが SP11 に対する一定の反応性を保持していることを示唆するものでもあった。さらに、自家不和合性 *B. rapa* から調製した乳頭細胞プロトプラストにおいても自己 SP11 処理による特異的な Ca^{2+} 濃度上昇を示すことを証明し、本反応がアブラナ科植物の自家不和合性情報伝達系において共通に機能していることを明らかにした。

次に筆者は、この Ca^{2+} 濃度上昇の自家不和合性情報伝達系における生理的意義を明らかにするために、人為的に乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させてその効果を解析する実験を行った。熱膨張式レーザーマイクロインジェクション装置を用いて乳頭細胞内の Ca^{2+} 濃度を自家受粉時と同程度にまで上昇させた後に、和合性の花粉を受粉させたところ、乳頭細胞から花粉への給水が阻害され、花粉の吸水率が有意に低下することが示された。本実験により、乳頭細胞内の Ca^{2+}

濃度上昇が、花粉の吸水阻害に至る自家不和合性反応の主要経路として機能していることが明らかとなった。

さらに筆者は、自家不和合性反応時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす分子実体に迫るため、乳頭細胞プロトプラストを用いた薬理的解析を行った。細胞膜局在型の Ca^{2+} チャンネルに対する阻害剤、ならびに Ca^{2+} -free 培地を用いた実験結果から、本反応は細胞膜を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入を介して行われていることが明らかとなった。さらに、より特異的な Ca^{2+} 輸送体阻害剤を用いた解析結果より、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である AP-5 が、この Ca^{2+} 濃度上昇を完全に抑制することを見出した。また、この阻害剤を柱頭へ前処理すると自家不和合性が打破されることが示され、AP-5 感受性のグルタミン酸受容体を介した乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入により、自家不和合性反応が惹起されていることが明らかとなった。

最後に、自家不和合性反応に関わるグルタミン酸受容体分子を特定するための実験を行った。当研究室において取得された乳頭細胞トランスクリプトーム解析のデータをもとに、乳頭細胞内で強く発現している4つのグルタミン酸受容体遺伝子を候補として抽出し、当研究室が保有している TILLING ライブラリーから変異株スクリーニングを行ったところ、これら4つの候補遺伝子全てに対するナンセンス変異株を取得することに成功した。これらのナンセンス変異株に交配により *SRK* および *YC3.60* 遺伝子を導入して解析を行った結果、少なくとも *GLR3.7* と *GLR3.5* の2つのグルタミン酸受容体のナンセンス変異株において、不和合反応時に誘起される乳頭細胞プロトプラスト内 Ca^{2+} 濃度上昇が有意に低下することを見出した。さらに、野生型 *GLR3.7* を *GLR3.7* のナンセンス変異株に導入する相補実験を行ったところ、不和合反応時の Ca^{2+} 濃度上昇が野生株と同程度にまで回復することが確認された。以上の結果により、少なくとも *GLR3.7* と *GLR3.5* の2分子種を含むグルタミン酸受容体が自家不和合性反応時における乳頭細胞内への Ca^{2+} 流入に関与していることが強く示唆された。

本論文により、*SRK* 受容体型キナーゼの下流でグルタミン酸受容体の活性化が誘導され、その結果 Ca^{2+} 流入が起こり、自己花粉の吸水反応を阻害することが明らかとなった。*SRK* が *SP11* を受容し、自己リン酸化した後のグルタミン酸受容体のチャンネルの開口に至るまでのメカニズムは未解明であるが、本研究において確立した乳頭細胞プロトプラストの系を用いてこの経路が解明されれば、自家不和合性のみならず、グルタミン酸受容体に関与すると予測されている他の植物の生理反応の解明にも貢献することができるだろう。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学研究室、高山誠司教授のもと 2009 年 7 月から 2014 年 1 月までの約 5 年間にわたり行われました。

本研究を行うにあたり、非常に魅力的で興味深いテーマと素晴らしい研究環境を与えてください、常に的確な御助言を賜りました高山誠司教授に心から感謝申し上げます。

研究をはじめ、ラボセミナー等で様々な御指導、御助言を賜りました同大学岩野恵助教、村瀬浩司助教、柴博士助教、和田七夕子助教に厚くお礼申し上げます。特に、岩野恵助教には、Ca²⁺関連の実験において様々なご指導、御助言を賜りましたこと深く感謝致します。

実験を行う上で、有益な御助言、実験手法等を御教示賜りました垣田満博士、Pulla Nakayama 博士、下里裕子博士、円谷徹之博士、三浦栄子博士、久保健一博士、樽谷芳明博士には心より感謝いたします。

研究を行う上で、実験植物の栽培や管理においてお世話になりました両条淑恵氏、岡村桃子氏、吉村裕子氏に深く感謝いたします。また、書類の手続きや研究室生活における様々な場面でお世話になりました阿部愛氏には心から感謝申し上げます。また、細胞間情報学研究室の先輩、同期、後輩の皆様には、本研究を行うにあたり大変お世話になりました。この場を借りて、御礼申し上げます。

本論文の審査委員である同大学、横田明穂教授、橋本隆教授、梅田正明教授には、修士課程の頃からサマーキャンプ、ヒアリング等を含め、的確な御指導、御助言を賜りましたこと、深く感謝いたします。

最後に、5 年間にわたる研究生生活を温かく見守り、支えてくださいました両親、家族に深く感謝いたします。

参考文献

- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., and Berkowitz, G.A. (2007). Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19: 1081-1095.
- Berridge, M., Lipp, P., and Bootman, M. (1999). Calcium signalling. *Curr. Biol.* 11: R157-R159.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-1440.
- Bosch, M., and Franklin-Tong, V.E. (2008). Self-incompatibility in *Papaver*: signaling to trigger PCD in incompatible pollen. *J. Exp. Bot.* 59: 481-490.
- Cheval, C., Aldon, D., Galaud, J.P., and Ranty, B. (2013). Calcium-calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833: 1766-1771.
- Christian, M., Qi, Y., Zhang, Y., and Voytas, D.F. (2013). Targeted Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using Engineered TAL Effector Nucleases (TALENs). *G3.* 3: 1697-1705.
- Davenport, R. (2002). Glutamate receptors in plants. *Ann. Bot.* 90: 549-557.
- de Nattencourt, D. (2001). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated plants. *Springer-Verlag.* (edn2)
- Dickinson, H.G. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8: 1-10.
- Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 593-620.

Dubos, C., Huggins, D., Grant, G.H., Knight, M.R., and Campbell, M.M. (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant J.* 35: 800-810.

Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1990). The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytol.* 144: 511-518.

Franklin-tong, V.E., Ride, J.P., Read, N.D., Trewavas, A.J., and Franklin, F.C.H. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.* 4: 163-177.

Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., and Goring, D.R. (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 382-387.

Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., Shoguchi, E., and Sawada, H. (2008). Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science* 320: 548-550.

Hodgkin, T., Lyon, G.D., and Dickinson, H.G. (1988). Recognition in flowering plants: a comparison of the Brassica self-incompatibility system and plant pathogen interactions. *New Phytol.* 110: 557-569.

五十嵐 元子 (2014). Identification of genes that regulate Ca^{2+} dynamics in papilla cells during pollination in the Brassicaceae. 博士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Iwamoto, T., Watano, T., and Shigekawa, M. (1996). A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na^+/Ca^{2+} exchange in cells expressing NCX1. *J. Biol. Chem.* 271: 22391-22397.

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

Jammes, F., Hu, H.C., Villers, F., Bouten, R., and Kwak, J.M. (2011). Calcium-permeable channels in plant cells. *FEBS J.* 278: 4262-4276.

Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., and Becker, D. (2010). Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J.* 62: 367-378.

Joung, J.K., and Sander, J.D. (2012). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14: 49-55.

Julio-Pieper, M., Flor, P.J., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2011). Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues. *Pharmacol. Rev.* 63: 35-58.

Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S. (2007a). 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.

Kakita, M., Shimosato, H., Murase, K., Isogai, A., and Takayama, S. (2007b). Direct interaction between *S*-locus receptor kinase and *M*-locus protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. *Plant Biotech.* 24: 185-190.

金谷 麻加 (2008). アブラナ科植物の自家不和合性における情報伝達系の解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Kitashiba, H., Liu, P., Nishio, T., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (2011). Functional test of Brassica self-incompatibility modifiers in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 18173-18178.

Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067-1078.

Kwaaitaal, M., Maintz, J., Cavdar, M., and Panstruga, R. (2012). On the ligand binding profile and desensitization of plant ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels functioning in MAMP-triggered Ca^{2+} influx. *Plant Signal Behav.* 7: 1373-1377.

Lai Kok Song (2012). Development and application of a new TILLING resource for the studies of sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. 博士論文 (奈良先端科学技术大学院大学)

Lai, K.S., Kaothien-Nakayama, P., Iwano, M., and Takayama, S. (2012). A TILLING resource for functional genomics in *Arabidopsis thaliana* accession C24. *Genes Genet. Syst.* 87: 291-297.

Lam, H.M., Chiu, J., Hsieh, M.H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., and Couruzzi, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396: 125-126.

Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, O., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38: 527-538.

Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14: 2627-2641.

Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defense-signaling pathways. *New Phytol.* 171: 249-69.

Li, F., Wang, J., Ma, C., Zhao, Y., Wang, Y., Hasi, A., and Qi, Z. (2013). Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162: 1497-1509.

Ma, W., Qi, Z., Smigel, A., Walker, R.K., Verma, R., and Berkowitz, G.A. (2009). Ca^{2+} , cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 20995-1000.

Ma, Y., Walker, R.K., Zhao, Y., and Berkowitz, G.A. (2012). Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 19852-19857.

Mayer, M.L., MacDermott, A.B., Westbrook, G.L., Smith, S.J., and Barker, J.L. (1987). Agonist-and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo III. *J. Neurosci.* 7: 3230-3244.

Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S-1015S.

Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.H., Obermeyer, G., and Feijo, J.A. (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by D-serine. *Science* 332: 434-437.

Mishima, M., Takayama, S., Sasaki, K., Jee, J.G., Kojima, C., Isogai, A., and Shirakawa, M. (2003). Structure of the male determinant factor for *Brassica* self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* 278: 36389-36395.

Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., and Farmer, E.E. (2013). Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500: 422-426.

Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* 303: 1516-1519.

Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expand dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 10554-10559.

Nasrallah, M.E., Liu, P., Sherman-Broyles, S., Boggs, N.A., and Nasrallah, J.B. (2004). Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 16070-16074.

Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (1993). Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6: 79-86.

Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuriowa, T., Nakano, A., Kanaoka, M.M., Dresselhaus, T., Sasaki, N., and Higashiyama, T. (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458: 357-361.

Parre, E., Ghars, M.A., Leprince, A.S., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, M., Richard, L., Mazars, C., Abdely, C., and Savoure, A. (2007). Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144: 503-512.

Qi, Z., Stephens, N.R., and Spalding, E.P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* 142: 963-971.

Rea, A.C., Liu, P., and Nasrallah, J.B. (2010). A transgenic self-incompatible *Arabidopsis thaliana* model for evolutionary and mechanistic studies of crucifer self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* 61: 1897-1906.

Roy, S.J., Gilliam, M., Berger, B., Essah, P.A., Cheffings, C., Miller, A.J., Davenport, R.J., Liu, L.H., Skynner, M.J., Davies, J.M., Richardson, P., Leigh, R.A., and Tester, M. (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31: 861-871.

Safavian, D., and Goring, D.R. (2013). Secretory activity is rapidly induced in stigmatic papillae by compatible pollen, but inhibited for self-incompatible pollen in *Brassicaceae*. *Plos One.* 8: e84286.

Saito, T., Shiba, K., Inaba, K., Yamada, L., and Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 4158-4162.

Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L., and Goring, D.R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell* 21: 2655–2671.

Samuel, M.A., Tang, W., Jamshed, M., Northey, J., Patel, D., Smith, D., Siu, K.W., Muench, D.G., Wang, Z.Y., and Goring, D.R. (2011). Proteomic analysis of *Brassica* stigmatic proteins following the self-incompatibility reaction reveals a role for microtubule dynamics during pollen responses. *Mol. Cell Proteomics* 10: M111.011338.

Sanabria, N., Goring, D., Nürnberger, T., and Dubery, I. (2008). Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol.* 178: 503-514.

Sanders, D., Brownlee, C., and Harper, J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.

Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700.

Sherman-Broyles, S., Boggs, N., Farkas, A., Liu, P., Vrebalov, J., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (2007). S locus genes and the evolution of self-fertility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 94-106.

下里 裕子 (2002). 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解明. 博士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Skeberdis, V.A., Chevalyere, V., Lau, C.G., Goldberg, J.H., Pettit, D.L., Saudicani, S.O., Lin, Y., Bennett, M.V., Yuste, R., Castillo, P.E., and Zukin, R.S. (2006). Protein

kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* 9: 501-510.

Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., and Goring, D.R. (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15: 885-898.

Stone, S.L., Arnoldo, M., and Goring, D.R. (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science* 286: 1729-1731.

杉村 真理 (2008). アブラナ科植物の受粉・受粉過程において機能する水および Ca^{2+} 輸送系の探索. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Takada, Y., Sato, T., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., and Watanabe, M. (2013). Involvement of MLPK pathway in intraspecies Unilateral Incompatibility regulated by a single locus with stigma and pollen factors. *G3*. 3: 719-726.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (2000). The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403: 913-916.

Takayama S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.S., Watanabe, M., Iwano, M., and Isogai, A. (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413: 534-538.

Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S., Kai, N., and Watanabe, M. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1920-1925.

武久 昌嗣 (2009). シロイヌナズナを用いたアブラナ科植物自家不和合情報伝達機構の解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

田中 正樹 (2011). アブラナ科植物の和合・不和合受粉時における乳頭細胞内の Ca^{2+} 変動解析と Ca^{2+} 輸送体の薬理的解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)

Tapken, D., Anschutz, U., Liu, L.H., Huelsken, T., Seebohm, G., Becker, D., and Hollman, M. (2013). A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Sci. Signal* 6: ra47.

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 62: 405-496.

Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Stadler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K.K. (2010). Evolution of self-incompatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature.* 464: 1342-1346.

Vasta, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A., and Pugin, A. (2011). Involvement of putative glutamate receptors in plant defense signaling and NO production. *Biochimie.* 93: 2095-2101.

Vincil, E.D., Bieck, A.M., and Spalding, E.P. (2012). Ca²⁺ conduction by an amino-acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol.* 159: 40-46.

Walch-Liu, P., and Forde, B.G. (2007). L-glutamate as a novel modifier of root growth and branching; what's the sensor?. *Plant Signal Behav.* 2: 284-286.

Wan, J., Tanaka, K., Zhang, X.C., Son, G.H., Brechenmacher, L., Nguyen, T.H., and Stacey, G. (2012). LYK4, a lysine motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 160: 396-406.

Watkins, J.C., and Jane, D.E. (2006). The glutamate story. *Br. J. Pharmacol.* 147: S100-S108.

Wheeler, M.J., de Graaf, B.H., Hadjiosif, N., Perry, R.M., Poulter, N.S., Osman, K., Vatovec, S., Harper, A., Franklin, F.C., and Franklin-Tong, V.E. (2009). Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* 459: 992-995.

Wheeler, M.J., Vatovec, S., and Franklin-Tong, V.E. (2010). The pollen *S*-determinant in *Papaver*: comparisons with known plant receptors and protein ligand partners. *J. Exp. Bot.* 61: 2015-2025.

White, P.J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 171-189.

矢加部 亮 (2009). アブラナ科植物の和合・不和合受粉過程の解明. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)