

# 論文内容の要旨

申請者氏名 伊藤 花菜江

多くの植物は自家不和合性と呼ばれる機構を有し、自殖を回避して遺伝的多様性を維持している。アブラナ科植物では、雌ずい先端の乳頭細胞膜上の受容体型キナーゼ SRK (S-receptor kinase) と花粉表層の低分子タンパク質 SP11 (S-locus protein 11) とのハプロタイプ特異的な結合を介して不和合反応が誘起され、自己花粉の吸水・発芽が阻害される。しかし、自己花粉の排除に至るまでの SRK 下流の情報伝達経路は未解明のまま残されている。本研究では、当研究室において見出された自家受粉時の乳頭細胞内の一過的な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に着目し、本生理変化と不和合反応との因果関係や関与する分子の実体解明を通じ、本情報伝達経路を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、まず SRK と  $\text{Ca}^{2+}$  センサータンパク質 YC3.60 を共発現させた *Arabidopsis thaliana* より乳頭細胞プロトプラストを調製する手法を確立し、自己 SP11 の添加によって  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が特異的に誘起されることを明らかにした。同様の反応は、自家不和合性 *Brassica rapa* より調製した乳頭細胞プロトプラストに  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fluo4-AM を取り込ませた系でも確認され、本生理変化が SP11/SRK 相互作用の下流で直接的に誘起されることを明らかにした。次に、マイクロインジェクション装置を用いて乳頭細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を自家受粉時と同程度にまで上昇させると、和合性の花粉を受粉しても吸水が阻害されることを見出した。以上の結果は、SP11/SRK 下流で誘起される乳頭細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が、花粉の吸水阻害に至る不和合反応の直接的な要因となっていることを強く示唆した。

第 2 章では、本  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に関わる輸送体の実体解明を目指した。乳頭細胞プロトプラストを用いた生理・薬理的解析により、この  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が必須であること、また AP-5 などのグルタミン酸受容体阻害剤がこの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を特異的に阻害することを明らかにした。さらに、AP-5 を柱頭に前処理すると、自家不和合性が打破されることを見出した。そこで、当研究室において取得された乳頭細胞のトランスクリプトーム解析データを元に、乳頭細胞において強く発現している GLR3.7、GLR3.5、GLR3.3、GLR1.3 の 4 つのグルタミン酸受容体に着目し、これらの生理機能を解析することにした。RNAi 法による発現抑制体の取得が成功しなかったため、当研究室で TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 用に作製された変異株ライブラリーを探索し、各々のナンセンス変異体を取得することに成功した。これらの内、*glr3.7* 及び *glr3.5* 変異体において、不和合受粉時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が有意に減少することが示され、少なくともこれら 2 分子種を含むグルタミン酸受容体が自家不和合性の情報伝達経路に関与することが明らかとなった。

本研究の成果は、これまでほとんど未解明であったアブラナ科植物の自家不和合性情報伝達経路に関して新たな知見を与えるものである。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 伊藤 花菜江

アブラナ科植物の自家不和合性は、一遺伝子座上にコードされた雌ずい乳頭細胞膜上の受容体型キナーゼ **SRK** と花粉表層リガンド **SP11** とのハプロタイプ特異的な相互作用により誘起されることが示されているが、自己花粉排除に至るまでの **SRK** 下流の情報伝達経路については未解明である。自家受粉時特異的な乳頭細胞内の生理変化や、**SRK** との相互作用等により同定された下流因子候補について複数の報告が成されているが、いずれも不和合反応との関連性を示す明確な実験的証拠は得られていない。

こうした状況下において申請者は、自家受粉時に乳頭細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が一過的に上昇するという 1 つの観察結果に着目し、精緻な実験に基づく独自性の高い研究を展開し、以下の知見を明らかにした。

まず、独自に確立した乳頭細胞プロトプラストの実験系を利用して、この  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が自己の **SP11** リガンドにより直接的に誘起されることを証明した。また、同実験系を利用した生理・薬理的解析により、この  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関与すること、**AP-5** などのグルタミン酸受容体阻害剤が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を強力に阻害することを明らかにした。次に、この  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に関与する輸送体の特定に着手し、トランスクリプトームデータを基に乳頭細胞内で強く発現する **GLR3.7**、**GLR3.5**、**GLR3.3**、**GLR1.3** の 4 つのグルタミン酸受容体をチャンネル分子候補として抽出した。さらに、**TILLING** 法により各々のナンセンス変異体を取得し、これらの内の **GLR3.7** と **GLR3.5** の少なくとも 2 種類のグルタミン酸受容体が **SP11** 処理時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に関与していることを明らかにした。さらに、マイクロインジェクションを用いて乳頭細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を自家受粉時程度まで人為的に上昇させると本来不和合性の花粉の吸水も阻害されること、逆に **AP-5** を乳頭細胞に前処理すると自家不和合性が打破されることを示し、グルタミン酸受容体を介した乳頭細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が花粉排除に至る不和合反応を誘起する直接的要因となっていることを明らかにした。

以上のように、本論文はアブラナ科植物の自家不和合性において、**SP11** リガンドによる **SRK** 受容体キナーゼの活性化の下流で、グルタミン酸受容体を介した乳頭細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が自家不和合性情報伝達系の主経路として機能し、自己花粉の吸水反応を阻害していることを初めて明らかにしたものである。植物における受容体型キナーゼの下流の新たな情報伝達経路を提示した研究として関連研究領域に対する波及効果も高く、学術上応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。