

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570056

研究課題名(和文) アブラナ科植物の和合受粉過程を誘導するシグナルとその情報伝達系の解析

研究課題名(英文) Analysis of signal transduction induced by compatible signals in the Brassicaceae

研究代表者

岩野 恵 (Iwano, Megumi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50160130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物では、雌蕊先端の乳頭細胞に様々な花粉が付着しても、同種他家花粉が受粉した場合にのみ、花粉の発芽がおこり受精が成立する。研究代表者は、アブラナの花粉に同種の雌蕊に対してその花粉を受容するのに必要な一連の反応を誘起する何らかの因子(和合シグナルとよぶ)が存在する可能性を見いだしてきた。しかしその実体は明らかではなかった。本研究では、和合シグナルを単離するための抽出方法を確立し、和合シグナルにより発現誘導される雌蕊柱頭の遺伝子群をトランスクリプトーム解析により同定した。遺伝子破壊株やイメージングによる解析から、乳頭細胞膜のCaポンプ(ACA13)が花粉発芽時に機能することを示した。

研究成果の概要(英文)：In the Brassicaceae, intraspecific non-self pollen (compatible pollen) can germinate and grow into stigmatic papilla cells, while self pollen or interspecific pollen is rejected at this stage. However, the mechanisms underlying this selective acceptance of compatible pollen remain unclear. Here, using a cell-impermeant calcium indicator, we showed that the compatible pollen coat contains signaling molecule(s) that stimulate Ca²⁺ export from the papilla cells. Transcriptome analyses of stigmas suggested that autoinhibited Ca²⁺-ATPase 13 (ACA13) was induced after both compatible pollination and compatible pollen coat treatment. ACA13 protein localized to the plasma membrane. The stigma of a T-DNA insertion line of ACA13 exhibited reduced Ca²⁺ export, as well as defects in compatible pollen germination and seed production. These findings suggest that stigmatic ACA13 functions in the export of Ca²⁺ to the compatible pollen tube, which promotes successful fertilization.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：アブラナ科植物 カルシウムイオン 和合受粉 Calcium ATPase

1. 研究開始当初の背景

古くからアブラナ科植物の育種においては、異種花粉の混合受粉により異種間雑種の作出が可能になる「メントール花粉効果」と呼ばれる現象が知られている (Babadjanyan, 1962)。

これまでに、研究代表者は *Brassica rapa* や *Arabidopsis thaliana* を使って、細胞内外の $[Ca^{2+}]$ やアクチン、ROS などのモニタリング系を構築してきた。そして、同種の和合受粉時特異的に、乳頭細胞から花粉への Ca^{2+} を含む水の移動が起きること、花粉直下の乳頭細胞内でアクチンの重合・束化が促進されること、小胞体 (ER) や液胞の集積が起きることなどを明らかにしてきた (Iwano *et al.*, 1999, 2004, 2007)。さらに、こうした一連の生理変化が同種他家の花粉表層物質により誘導されたことから (Iwano *et al.*, 2007)、花粉表層物質中にはこれら一連の生理変化を誘導する何らかの因子 (「和合シグナル」) が存在することが示唆された。そして、この「和合シグナル」が「メントール花粉効果」を誘導する種認識に関わる分子であると推測した。

しかし、この「和合シグナル」は、種間不和合性の機構を解明する上で鍵を握ると予測されるが、その実体については全く未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物の *B. rapa* と *A. thaliana* を用いて、「和合シグナル」の実体を解明することと、そのシグナルにより乳頭細胞内に誘起される情報伝達系を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまでの「和合シグナル」が細胞外への Ca^{2+} 輸送を誘導するという性質を利用して、以下の生化学的、分子生物学的、遺伝学的解析により「和合シグナル」の探索と下流の情報伝達系の解明を行なうことを考えた。

1) 「和合シグナル」アッセイ系による性状解析、

2) マイクロダイセクション・次世代シーケンサーによる「和合シグナル」候補遺伝子の同定、

3) 「和合シグナル」下流情報伝達系の生理学的・分子生物学的解析

4. 研究成果

1) 「和合シグナル」アッセイ系による性状解析

最初に新規のアッセイ系を構築した。即ち、アガロースビーズに膜不透過性のカルシウム親和性蛍光指示薬カルシウムグリーン水溶液を吸収させ乾燥させた後に、花粉表層抽出物 (画分) をマニピュレーターで添加し、上記カルシウムグリーン封入アガロースビ

ーズを擬似花粉に見立ててのせ、カルシウムグリーン蛍光変化を調べるという方法である。

これまでのアッセイ系では、*B. rapa* 花粉のシクロヘキサン抽出物中に乳頭細胞からの水・Ca を排出する活性物質 (和合シグナル物質) が含まれることを見いだしてきた。そこで、この抽出画分を更にクロロホルム・メタノール処理により、脂溶性と水溶性とに分画し、活性判定を行った。その結果、脂溶性・水溶性共に活性が認められず、少なくとも和合シグナル分子は脂溶性物質ではないことが明らかになった。しかし、この抽出法では殆どのタンパク質が変性してしまっている為、タンパク質物質であるか否かは判断できなかった。そこで、花粉を水で抽出した場合にもシクロヘキサン抽出物と同様な活性が認められたため、水抽出物をゲル濾過により分離分画し、アッセイに供した。これまでにタンパク質の溶出画分で活性が認められ、和合シグナル分子はタンパク質分子であることが示唆された。

2) マイクロダイセクション・次世代シーケンサーによる「和合シグナル」候補遺伝子の同定、

花粉表層物質は、花粉小胞子だけでなく葯のタペート細胞でも産出される。そこで、*B. rapa* 葯組織のパラフィン切片より、マイクロダイセクションによりタペート細胞と花粉小胞子とを回収し、次世代シーケンサー (FLX455, Roche) により両組織での遺伝子発現プロファイルを作成した。解析の結果、両組織で発現量の高い上位 200contig には、CRP (cysteine-rich protein) が 10% も含まれていることが明らかとなった。CRP 群には、自家不和合性因子 SP11 を始め、受粉から受精に至る過程において花粉の選抜に関わる因子が含まれており、今回得られた新規 CRP 群中に和合シグナル分子が含まれていることが期待された。

3) 「和合シグナル」下流情報伝達系の生理学的・分子生物学的解析

和合シグナルにより誘起される遺伝子を探索するために、受粉後あるいは花粉表層物質付着後に誘導される遺伝子群を同定した。誘導された 255 遺伝子の中から Ca^{2+} 輸送活性を持つ Ca^{2+} ポンプ、*Autoinhibited Ca²⁺ ATPase 13 (ACA13)* を見出した。本遺伝子破壊株では、種子数の低下、花粉の発芽遅延、カルシウムグリーンアッセイにおける蛍光量減少が観察された。また、GFP レポーターアッセイと免疫電顕法により ACA13 は細胞膜とゴルジベシクルに局在しており、受粉時には花粉発が部位周辺に集積することが示された。以上の結果から、ACA13 は和合受粉時の Ca^{2+} 輸送に関わっていることが示唆された (Iwano *et al.* 2014)。

和合受粉時には乳頭細胞から花粉へのカルシウムの供給がおこることを示してきた。しかし、他のイオンについての情報はなかった。本年度、EDXシステムを装着した走査電顕を用い、さらに受粉過程の観察・元素分析を凍結条件下で行なうことにより、乳頭細胞から花粉へKとClが供給されることが新たに明らかになった。従って、和合シグナルを受容した乳頭細胞では、Caイオン、Kイオン、Clイオンの輸送体が機能することが示された。そこで、これに関わる分子を探索するために、シロイヌナズナ乳頭細胞のレーザーマイクロダイセクション・次世代シーケンサー解析あるいはマイクロアレイ解析により乳頭細胞特異的に発現する遺伝子を探索した（Osaka et al., 2013）。その結果、乳頭細胞特異的に発現し、しかも発現量が非常に高い、6回膜貫通型のチャネル様分子を見出した。この遺伝子単独の遺伝子破壊株では顕著な表現型は見られなかったが、2重3重変異体では種子数が減少し、吸水発芽遅延が見られた。しかも、上記のEDXシステムで変異体の元素分析を行なったところ、受粉後の花粉でCl量の減少がみられた。従って、シロイヌナズナの受粉過程で機能する遺伝子であることが示唆された。今後より詳細な解析が必要であると考えている。

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 12 件）

1. Iwano, M., Igarashi, M., Tarutani, Y., Kaothien-Nakayama, P., Nakayama, H., Moriyama, H., Yakabe, R., Entani, T., Shimosato-Asano, H., Ueki, M., Tamiya, G., and Takayama, S. A pollen coat-inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell*, 査読有, 26 (2), 2014, 636-649, DOI : 10.1105/tpc.113.121350
2. Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, H., Higashiyama, T., Takayama, S., Abe, M., and Kuchitsu, K. (2014). Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell*, 査読有, 26 (3), 2014, 1069-1080, DOI : 10.1105/tpc.113.120642
3. Lao, X., Suwabe, K., Niikura, S., Kakita, M., Iwano, M., and Takayama, S. Physiological and Genetic Analysis of CO₂-Induced Breakdown of Self-Incompatibility in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.*, 査読有, 65 (4), 2014, 939-951, DOI : 10.1093/jxb/ert438
4. Osaka, M., Matsuda, T., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Maeda, S., Sewaki, M., Sone, M., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K.K., Yano, K., Lim, Y.P., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. Cell Type-Specific Transcriptome of Brassicaceae Stigmatic Papilla Cells from a Combination of Laser Microdissection and RNA Sequencing. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 54 (11), 2013, 1894-1906, DOI : 10.1093/pcp/pct133
5. Nakamura, N., Iwano, M., Havaux, M., Yokota, A., and Munekage, Y.N. Promotion of Cyclic Electron Transport around Photosystem I during the Evolution of NADP-Malic Enzyme-Type C4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*. *New Phytol.*, 査読有, 199 (3), 2013, 832-842, DOI : 10.1111/nph.12296
6. Lai, K.-S. Kaothien-Nakayama, P., Iwano, M., and Takayama, S. A TILLING resource for functional genomics in *Arabidopsis thaliana* accession C24. *Genes Genet. Syst.*, 査読有, 87 (5), 2012, 291-297, DOI : 10.1266/ggs.87.291
7. Iwano, M., Ngo, Q.A., Entani, T., Shiba, H., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A., Grossniklaus, U. and Takayama, S. Cytoplasmic Ca²⁺ changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells. *Development*, 査読有, 139 (22), 2012, 4202-4209, DOI : 10.1242/dev.081208
8. Kobayashi, K. and Iwano, M. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol.*, 査読有, 85 (1), 2012, 51-66, DOI : 10.1111/j.1365-2958.2012.08094.x
9. Iwano, M. and Takayama S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Curr Opin Plant Biol.*, 査読有, 15 (1), 2012, 78-83, DOI : 10.1016/j.pbi.2011.09.003
10. Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Susaki, D., Ikeda, Y., Iwano, M., Takayama, S., Higashiyama, T., Kakutani, T. and Kinoshita, T. HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev Cell*. 査読有, 21 (3), 2011, 589-596, DOI : 10.1016/j.devcel.2011.08.013
11. Hirai, H., Takai, R., Iwano, M., Nakai, M., Kondo, M., Takayama, S. Isogai, A., and Che, F. S. Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by *Acidovorax avenae* flagellin. *J. Biol.*

Chem., 査読有, 286 (29), 2011, 25519-25530, DOI : 10.1074/jbc.M111.254029

- Matsui, T., Tabayashi, A., Iwano, M., Shinmyo, A., Kato, K., and Nakayama, H. Activity of the C-terminal-dependent vacuolar sorting signal of horseradish peroxidase Cl α is enhanced by its secondary structure. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 52 (2), 2011, 413-420, DOI : 10.1093/pcp/pcq205

〔学会発表〕(計14件)

1. 岩野 恵、伊藤 花菜江、浅野(下里)裕子、五十嵐 元子、高山 誠司、アブラナ科植物の和合・不和合受粉過程における情報伝達系の解析、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学(富山)
2. 岩野 恵、伊藤 花菜江、浅野(下里)裕子、五十嵐 元子、岩尾 康宏、高山 誠司、アブラナ科植物自家不和合性の分子メカニズム、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際会議場(神戸)
3. Iwano, M., Molecular mechanisms of self-incompatibility in the Brassicaceae, International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2012年11月14日、名古屋ガーデンパレス(名古屋)
4. 岩野 恵、伊藤 花菜江、浅野(下里)裕子、小池 千恵子、高山 誠司、アブラナ科植物の自家不和合性の分子機構、第83回日本動物学会関連集会「受精研究の現在とこれから～普遍性と多様性、そして進化の解明を目指して」, 2012年9月13日、大阪大学(大阪)
5. 岩野 恵、伊藤 花菜江、小池 千恵子、永井 里奈、高山 誠司、バイオイメージングによるアブラナ科植物自家不和合性の生理学的解析、第68回日本顕微鏡学会シンポジウム「バイオイメージングにより明らかにされた動・植物の有性生殖メカニズム」, 2012年5月14日、つくば国際会議場(筑波)
6. Iwano, M., Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae, XXII International Congress on Sexual Plant Reproduction, 2012年2月14日、University of Melbourne(Australia)
7. 岩野 恵、アブラナ科植物の受粉過程におけるCa²⁺の関与、第12回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、2011年11月26日、浜松市駅ビル「メイワン」(静岡)
8. 岩野 恵、アブラナ科植物受粉過程の超高压電顕トモグラフィー解析、超高压電子顕微鏡センター 医学・生物学系共同利用研究報告会、2011年11月22日、大阪大学(大阪)

9. 岩野 恵、電子線トモグラフィーによる植物細胞オルガネラの可視化技術の開発、植物電子顕微鏡若手ワークショップ 2011、2011年11月21日、理化学研究所(横浜)

〔図書〕(計3件)

1. 岩野 恵、掛田 克行、土屋 亨、化学同人、被子植物の受精1-自家不和合性因子の多様性と共通原理(第6章)、「動植物の受精学 共通機構と多様性(澤田均 編)」, 2014年、88-102(総ページ数352頁)
2. Iwano, M., K. Ito, H. Shimosato-Asano, K.S. Lai, S. Takayama. Springer, Heidelberg, Self-incompatibility in the Brassicaceae, "Sexual Reproduction in Animals and Plants (H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano : Eds.)", 2014, 245-254(総ページ数480頁).
3. 岩野 恵、株式会社エヌ・ティ・エス、花粉の世界をのぞいてみたら(医学生物学電子顕微鏡学会編)2012年、総ページ数368頁

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 恵 (Iwano, Megumi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50160130

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：