

## 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：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21112003

研究課題名(和文)アブラナ科植物におけるアロ認識機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of allo-recognition 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) 83,900,000円、(間接経費) 25,170,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物のアロ認識は、花粉表層のリガンドSP11と乳頭細胞膜上の受容体型キナーゼSRKを介した自他識別によりおこる。本研究では、SP11-SRK相互作用の下流で、いかにして自己の花粉の吸水・発芽が特異的に阻害されるのかを明らかにするために、自家不和合性シロイヌナズナを作出し、受粉時のCa<sup>2+</sup>イメージングを行なった。その結果、自家受粉時特異的な乳頭細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇を見出し、乳頭細胞プロトプラストによるin vitroアッセイ系により、この上昇が花粉側不和合因子SP11単独で誘起され、SRKのキナーゼ活性依存的であること、この上昇には細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility (SI) in the Brassicaceae is controlled by the S-haplotype-specific interaction between pollen ligand SP11 and its stigmatic receptor SRK. SP11/SCR binding to cognate SRK induces autophosphorylation of SRK, which triggers a signalling cascade leading to the rejection of self-pollen. Here we introduced calcium sensor protein Yellow Cameleon 3.60 gene into self-incompatible Arabidopsis thaliana transgenic plants expressing both SP11 and SRK. Self-pollination induced an increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> in papilla cells. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase was also induced in papilla cell-protoplasts by directly applying the cognate SP11/SCR. Furthermore, we found that wild type-pollen hydration could also be arrested by the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase resulting by microinjection of concentrated CaCl<sub>2</sub> solution. These results suggest that the SI-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase is a downstream event of SI signal transduction pathway that triggers rejection of self-pollen.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子・生理科学

キーワード：アブラナ科植物 アロ認識 自家不和合性 カルシウムイメージング シロイヌナズナ プロトプラスト

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の多くは自家不和合性により自殖を回避し、種の遺伝的多様性を維持している。アブラナ科植物では自己・非自己の花粉の識別は雌ずい先端の乳頭細胞上で行われ、自己の花粉の吸水・発芽が特異的に阻害される。研究代表者はこれまで、この自己識別反応が花粉表層の蛋白質リガンド SP11 と乳頭細胞膜上の受容体型キナーゼ SRK を介して行われていること、SRK 下流の情報伝達系に膜結合型細胞質キナーゼ MLPK が関与していることを見出してきたが、自家不和合性の全体像は未だ不明である。*Arabidopsis thaliana* は自家和合種であるが、近縁種である *Arabidopsis lyrata* 自家不和合種である。そこで、研究代表者は、*A. lyrata* 由来の *S<sub>b</sub>-SRK* 遺伝子と *S<sub>b</sub>-SP11/SCR* 遺伝子を *A. thaliana* C24 系統に導入することで自家不和合性のシロイヌナズナを作出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の自家不和合性シロイヌナズナをアブラナ科植物自家不和合性研究のモデル植物として研究材料に用い、自己花粉の吸水・発芽抑制に至るまでの自家不和合性情報伝達系の全容を生理学的・遺伝学的に明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、自家不和合性シロイヌナズナを用いて以下の研究を行なった。

- (1) 自家不和合性シロイヌナズナを用いた各種モニター系の構築
- (2) 自家不和合性情報伝達系に関わる分子の生化学的探索
- (3) マイクロアレイによる自家不和合性情報伝達系に関わる分子の網羅的解析
- (4) *Arabidopsis thaliana* C24系統のTILLINGリソースの構築

## 4. 研究成果

- (1) 自家不和合性シロイヌナズナを用いた各種モニター系の構築

### Ca<sup>2+</sup>モニタリング

和合不和合受粉時における Ca<sup>2+</sup>動態を明らかにするためには、雌蕊乳頭細胞で高発現の SRK 遺伝子のプロモーターの下流に Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質イエローカメレオン (YC3.60) 遺伝子を繋いだコンストラクトを自家不和合性シロイヌナズナに導入した。モニタリングの結果、不和合受粉 (SP11 発現花粉を受粉) 後 3 分から 5 分の間に花粉直下で Ca<sup>2+</sup>濃度の著しい上昇が見られ、その後その上昇は乳頭細胞先端部に広がり 10~15 分間継続した。また SP11 発現花粉を受粉させた乳頭細胞では、野生型花粉の吸水発芽が阻害されたことから、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と花粉の発芽との関係を明らかにするために、レーザー

マイクロインジェクターにより高濃度の CaCl<sub>2</sub> を直接インジェクションした。その結果、濃度依存的に花粉の吸水が阻害された。一方高濃度の KCl をインジェクションしても花粉の吸水阻害はおこらなかった。従って、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が直接的に花粉の吸水発芽阻害を誘導していることが示唆された。

次に Ca<sup>2+</sup>濃度上昇のメカニズムを明らかにするために、上記植物体から乳頭細胞のプロトプラストを調製した。この *in vitro* 解析系では *S<sub>b</sub>-SP11* 添加により一過的な Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観察されたが、*S<sub>b</sub>-SP11* 添加や *S<sub>b</sub>-SRK* を発現していない乳頭細胞プロトプラストではそのような上昇は見られなかった。またカイネース活性を失活させた *S<sub>b</sub>-SRK* 遺伝子を導入した植物体では、花粉の吸水発芽は阻害されず、プロトプラストの Ca<sup>2+</sup>濃度上昇もおこらなかった。また、GdCl<sub>3</sub> や LaCl<sub>3</sub> 存在下では Ca<sup>2+</sup>上昇は見られなかった。以上の結果から、自家 (不和合) 受粉時にみられる Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は、SP11-SRK の S 八プロタイプ特異的な相互作用により誘導され、細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入が必須であり、カイネース活性に依存することが明らかになった (分子生物学会発表、論文投稿準備中)。

次に、水溶性のカルシウム蛍光指示薬 (カルシウムグリーン) を柱頭に塗布して、受粉時の細胞外 Ca<sup>2+</sup>イメージングを行なった。その結果、和合受粉時においてのみ、花粉との接触部位・花粉管発芽部位において、細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が見られた。これは乳頭細胞からの Ca<sup>2+</sup>ポンプによる Ca<sup>2+</sup>排出によると考えられたので、トランスクリプトーム解析により (東北大田宮先生との共同研究) 候補遺伝子を探索したところ、乳頭細胞で高発現の *Autoinhibited Ca<sup>2+</sup> ATPase13 (ACA13)* が見出された。この遺伝子破壊株では、和合受粉時に Ca<sup>2+</sup>排出能の低下と発芽遅延がおこった。さらに、ライブセルイメージングと免疫電顕法により ACA13 の局在を調べたところ、受粉前には細胞膜とゴルジ小胞に局在するが、和合受粉時の花粉発芽時には花粉管との接触部位に集積することが明らかになった (Iwano et al., 2014)。一方不和合受粉時には、そのような集積は見られず、N 末端の調節領域を欠いた ACA13 を発現する自家不和合性シロイヌナズナでは、花粉の吸水発芽抑制が部分的に解除された。

以上の細胞内と細胞外の Ca<sup>2+</sup>イメージング解析から、不和合受粉時には Ca<sup>2+</sup>流出を抑制し Ca<sup>2+</sup>流入を誘導する機構が存在することが示唆された。

### アクチンイメージング解析

アクチンのイメージングのためには、アクチンマーカータンパク質 LifeAct を乳頭細胞で発現する植物体を作成した。その結果、不和合受粉時の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇直後にアクチン束の消失が見られた。このような消失は *Brassica rapa* でも観察されていたが、本研

究ではアクチン崩壊が  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の下流で起ることが示唆された。

## (2) 自家不和合性情報伝達系に関わる分子の生化学的探索

(1)の結果より、和合・不和合受粉時には細胞膜に存在するACA13の開閉による $\text{Ca}^{2+}$ 排出により、花粉の発芽が制御されている可能性が示唆された。そこで、ACA13の調節に関わるタンパク質を探索する目的で、GFP標識したACA13を乳頭細胞で発現する植物体と野生型の植物体から、受粉前、和合・不和合受粉後15分の柱頭をそれぞれ2,000個集め、その膜画分からGFP抗体による免疫沈降を行ない、LC-MS/MS解析を行なった(名古屋大澤田先生との共同研究)。その結果、和合受粉特異的タンパク質が12個、不和合受粉特異的タンパク質が2個同定された。和合受粉特異的なものには、カルモジュリンが含まれており、和合受粉時におけるACA13の活性化に関わると考えられた。今後これらの分子の解析により、和合・不和合受粉時の $\text{Ca}^{2+}$ 排出の調節機構が明らかになると期待できる。

## (3) マイクロアレイによる自家不和合性情報伝達系に関わる分子の網羅的解析

自家不和合性に関与する遺伝子は、乳頭細胞特異的発現遺伝子群や和合・不和合受粉時特異的に乳頭細胞で発現変動する遺伝子群に含まれる可能性がある。そこで、受粉前、受粉後15分、30分の雌蕊を固定・脱水し、パラフィンに包埋し、パラフィン切片を作製して、乳頭細胞のみをレーザーマイクロダイセクションにより回収してマイクロアレイ解析を行なった。その結果、乳頭細胞特異的発現遺伝子群として、325個の遺伝子が同定された。また受粉後15分では、和合・不和合受粉で発現に差異のある遺伝子は約10個しか見つからず、受粉後30分では、不和合受粉特異的に発現上昇した遺伝子は約100個、和合受粉時特異的なものは約150個に上昇した。自家不和合性のシロイヌナズナでは、受粉後約5分後には、自他識別がおこることがイメージングの解析から明らかになっており、受粉後15分で大きな変動が見られなかったことは、自家不和合性反応が転写制御ではないことを示唆している。

## (4) *Arabidopsis thaliana* C24系統のTILLINGリソースの構築

*A. thaliana* コロンビア系統やランズバーグ系統では、T-DNAタグラインが整備されており、遺伝子破壊株の取得が容易である。しかし、*A. thaliana* コロンビア系統に*A. lyrata*由来の自家不和合性因子を導入しても安定的な自家不和合性株は得られておらず、自

家不和合性候補遺伝子の機能解析のためには、*A. thaliana* C24株由来のリソースを完備する必要があった。そこで、*A. thaliana* C24株の種子をEMS処理しその後代から、TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)リソースを構築した(Lai et al., 2012)。Mutation densityは、1/345 kbであり、有用な逆遺伝学的ツール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16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  $\text{Ca}^{2+}$ -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).  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{CO}_2$ -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 Ca<sup>2+</sup> 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
  12. 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 C1a is enhanced by its secondary structure. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 52 (2), 2011, 413-420, DOI : 10.1093/pcp/pcq205
  13. 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*, 査読有, 19 (466), 2010, 983-986, DOI : 10.1038/nature09308
  14. 岩野 恵、永井 里奈、高山 誠司、アブラナ科植物の他家・自家受粉過程における乳頭細胞液胞の超高压電顕トモグラフィ解析、*超高压電子顕微鏡センター年報* 38, 査読有, 2010, 44-47. DOI 無し
  15. Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., 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 Physiol.*, 査読有, 150 (3), 2009, 1322-1334. DOI : 10.1104/pp.109.139329
  16. Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.S. (2009). The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J.* 査読有, 28(7), 2009, 926-936, DOI : 10.1038/emboj.2009.39
- 〔学会発表〕(計 25 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  $Ca^{2+}$  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)
  10. 岩野 恵、バイオイメーキングによるアブラナ科植物アロ認識機構の解析、第 32 回日本分子生物学会ワークショップ「動植物の受精とアロ認識機構」、2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜(横浜)
  11. 岩野 恵、アブラナ科植物におけるアロ認識機構、日本生化学会第 82 回大会シンポジウム「動植物におけるアロ認識機構」、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートピアホテル(神戸)
  12. Iwano, M., Three dimensional analysis of the vacuolar structure in papilla cells during self- and cross-pollination in Brassicaceae, 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009, 2009 年 9 月 16 日, Kobe university, Kobe.

〔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：