

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19333

研究課題名(和文)植物ステロイドホルモン「ブラシノステロイド」の生殖ホルモンとしての新機能解明

研究課題名(英文) Novel functions of plant steroid hormone brassinosteroid as a reproductive hormone

研究代表者

東山 哲也(Higashiyama, Tetsuya)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・教授

研究者番号：00313205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ブラシノステロイド(BR)はシロイヌナズナの花粉管、花柱・柱頭、胚珠それぞれに作用し、遺伝子発現プロファイルを変化させて活性化することを示した。花柱でのBRシグナルリング下流分子として、新分子の重要性も明らかとなった。花粉管において、BRの受容体BR11に加え、ホモログであるBRL2、BRL3の全ての遺伝子に異常をもつ3重変異体の花粉管においても、依然としてBRにより花粉管は反応性が向上した。花粉管で働く未知のBR受容体が存在することを示している。BR11に対するアンタゴニストとされる分子やその誘導体群にも促進活性があることが示され、新規受容体同定に向けた端緒を得た。特許の出願も完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブラシノステロイド(BR)が植物生殖における重要な生殖ホルモンであることを発見した。動植物において、ステロイド化合物が共通して生殖ホルモンとして働くことは興味深い。BRは雌雄の組織において大規模に遺伝子発現を変化させ、生殖を達成することがわかった。生殖過程で働く様々な有名な遺伝子が、BRにより発現が向上した。興味深いことに、花粉では、未知の受容体が存在することが示された。その同定にむけ、重要な研究になるとともに、今後ブラシノステロイドの起源にも迫ることが期待される。また栄養器官に影響をあたえず、生殖特異的なBRシグナルリング経路を人為的に制御することも可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Brassinosteroid (BR) had activity to activate Arabidopsis pollen tubes, stigmas/styles, and ovules, by changing gene expression profiles. As downstream molecules of BR signaling in the style, novel factors were shown as significant. In pollen tubes, knockout of the BR receptor BR11 and its homologues BRL2 and BRL3 did not abolish activation by BR. This clearly indicates existence of unknown receptor of BR. An agonist and its derivatives were shown to have BR activity, which would provide a way to identify unknown receptor. A patent has been applied.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：植物ステロイドホルモン ブラシノステロイド 花粉 植物生殖 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、植物の精細胞を運ぶ「花粉管」においても、動物の精子と同様に、メスの生殖器官を卵にむかって移動する間に生殖能(誘引物質に対する応答能)を獲得することを初めて発見した(Plant Cell, 1998)。トレニアという植物でのアッセイ系の開発から13年間におよぶ探索の結果、卵をつつむ組織(胚珠;はいしゅ)に由来し、生殖能獲得を促進する糖分子AMOR(アモール)の同定に成功した(Curr. Biol., 2016)。切り取った雌しべの一部を通過した花粉管にさらにAMORが作用することで、花粉管は生殖能を獲得する。しかし、合成AMORを高濃度で添加しても、雌しべを通過していない花粉管(培地上で発芽した花粉管)に生殖能を与えることはできなかった。このことは、AMORを受ける前段階として、花粉管は未知の因子を雌しべから受けている可能性を示唆する。このようななか、当研究室でモデル植物シロイヌナズナの花粉管培養条件を検討する中で、意外な分子が、シロイヌナズナ花粉管に対して強い生殖能獲得促進活性を持つことを発見した(未発表)。その因子とは、植物ホルモンの一つとして有名な、「ブラシノステロイド」である。ブラシノステロイドを培地に添加することにより、多くの花粉管が生殖能を獲得し、高頻度で胚珠に誘引された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物ホルモンの一つとして有名な、ブラシノステロイドの植物生殖における機能を解明することである。ブラシノステロイドは最初に花粉で発見されたものの、なぜ花粉に多いのか、その理由は解明されていない。一つの可能性として、花粉の中では、ブラシノステロイドのシグナリングに関わる遺伝子群がほとんど発現していないことが挙げられている。受容体BRIIをはじめ、シグナル経路に関わる分子が少ないためにリガンドが多く存在するとする説である。本研究では、植物のステロイドホルモン「ブラシノステロイド」の、生殖ホルモンとしての秘められた重要な機能を明らかにし、さらに未知のシグナル伝達機構を解明することを目指す。

3. 研究の方法

<ブラシノステロイド(BR)の生殖能獲得に対する促進効果の解析>

はじめにシロイヌナズナを用いて、雌しべ組織とBRの関係について明らかにする。雌しべ通過におけるBRの重要性を調べるために、BRの合成が阻害される*cyp90a1*変異体の雌しべを使用する。雌しべで作られたBRが、雌しべに対して作用する可能性も考えられるので、BRの受容体*bril*変異体の花柱や、BRIIシグナル経路が活性化された*bzr1-1D/bes1-D*変異体の花柱なども同時に使用する。また、シロイヌナズナでの予備実験で観察された、培地上で発芽した花粉管に対する生殖能獲得促進効果が、トレニアで見られるか調べる。

<花粉への作用メカニズムの解析>

花粉においてBRのシグナリングが働いているか調べる。予備的な実験では、BRを加えた培地で培養した花粉管では、雌しべを通過した場合に発現上昇する遺伝子の数割が上昇した。BRが転写の変化を介して作用していることを示唆しており、発現プロファイルの変化を明確にする。受容体BRII経路が働いているのか否かを明確にする。

<新規受容体探索への挑戦>

不思議なことに、予備的なデータではBRの受容体BRII、BRLs、BAK1をはじめとした、シグナリング経路タンパク質をコードする遺伝子群は、軒並みほとんど発現していない。花粉における主要受容体が他に存在する可能性を考え、BRのアゴニスト、アンタゴニスト、それらの新規誘導体の開発から解析を進める。また、遺伝学的解析の展開と、生殖ホルモンとしてのブラシノステロイドの起源を探るべく、コケ植物などを用いた新たな実験系の確立を目指す。

4. 研究成果

<ブラシノステロイド(BR)の生殖能獲得に対する促進効果の解析>

シロイヌナズナを用いて、雌しべ組織とBRの関係について解析した。BRの添加、*cyp90a1*変異体、*bril*変異体、*bzr1-1D*変異体などを用いた花粉管誘引率の解析およびトランスクリプトーム解析から、BRは花粉管、花柱・柱頭、胚珠、それぞれに作用し、遺伝子発現プロファイルを大きく変化させて、花粉管や雌組織を活性化することが示された。ブラシノステロイドの添加は、花粉管の遺伝子発現プロファイルを、花柱を通過した際の遺伝子発現プロファイルに近づけることが確認され、花粉管が花柱を通過することで活性化することの要因の一つと考えられた。胚珠では誘引物質の発現も上昇する。花柱自体にもBRが作用するが、花柱でのBRシグナリング

下流分子として、ROS のスカベンジャー分子の重要性が明らかとなった。一方で、培地上で安定してトレニアの花粉管を発芽させ胚珠と共培養する実験系ならびに技術の確立を進めた。トレニア花粉管でもシロイヌナズナ同様に、BR を加えた培地で発芽した花粉管は、発芽後に蛇行する傾向が見られた。BR が多くの植物で、花粉管の反応性に関与している可能性が示唆される。

< 花粉への作用メカニズムの解析 >

花粉において BR のシグナリングがどのように働いているか調べた。培地上で発芽した野生型花粉管に対して BR を与えた場合は、与えない場合に比べて 200 以上の遺伝子が 2 倍以上発現上昇し、雌しべを通過した花粉管の発現プロファイルに近づくことが明らかとなった。興味深いことに、花粉管の伸長に加え、誘引や精細胞放出など、様々な花粉管機能に重要な遺伝子群が、この中に見出された。BR11に加え、ホモログである BRL2、BRL3 の全ての遺伝子に異常をもつ 3 重変異体の花粉管においても、依然として BR により花粉管は反応性が向上した。このことは、花粉管で働く未知の BR 受容体が存在することを示している。

< 新規受容体探索への挑戦 >

花粉管において、BR シグナリングがどのように働いているか解析した。花粉管では、BR の受容体 BRI1、BRLs、BAK1 をはじめとした、シグナリング経路の遺伝子群は、ほとんど発現していなかった。BR11 プロモーターを用いた過剰発現マーカーも、発現が確認されなかった。BR のアゴニストや誘導体を用いて受容体探索を進めると同時に、花粉管で発現する遺伝子発現のプロファイルや、新たにゼニゴケの系など使いながら、探索を進めた。有機合成化学に関する共同研究が進展し、BR 受容体 BRI1 のアゴニストおよびアンタゴニストとされる分子をもとに、構造活性相関解析を進めた。これにより、BRI1 に対するアンタゴニストとされる分子やその誘導体群にも促進活性があることが明らかとなり、新規受容体同定に向けた端緒が得られた。特許の出願も完了した。花粉管の反応性だけで評価するのではなく、トランスクリプトーム解析も併用して分子の解析を進める方法が優れていることが明らかとなってきた。今後も探索を継続する。以上の結果をまとめ、主要な部分について論文を執筆中である。また、BR を用いた花粉管培養による共著論文を発表し始めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muro Keita, Matsuura-Tokita Kumi, Tsukamoto Ryoko, Kanaoka Masahiro M., Ebine Kazuo, Higashiyama Tetsuya, Nakano Akihiko, Ueda Takashi	4. 巻 1
2. 論文標題 ANTH domain-containing proteins are required for the pollen tube plasma membrane integrity via recycling ANXUR kinases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s42003-018-0158-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motomura Kazuki, Arae Toshihiro, Araki-Uramoto Haruka, Suzuki Yuya, Takeuchi Hidenori, Suzuki Takamasa, Ichihashi Yasunori, Shibata Arisa, Shirasu Ken, Takeda Atsushi, Higashiyama Tetsuya, Chiba Yukako	4. 巻 61
2. 論文標題 AtNOT1 Is a Novel Regulator of Gene Expression during Pollen Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 712 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Chieko, Tamura Kentaro, Nishimaki Satsuki, Yanagisawa Naoki, Matsuura-Tokita Kumi, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 0
2. 論文標題 KAKU4-mediated deformation of the vegetative nucleus controls its precedent migration over sperm cells in pollen tubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1101/774489	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Live-Cell Analysis of Multi-Step Signaling in Pollen Tube Guidance
3. 学会等名 The 11th Tri-National Arabidopsis Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Key molecules of sexual reproduction identified by live-cell and synthetic-chemistry approaches
3. 学会等名 22nd Plant Biology Symposium: Plant Cell Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Receptor-like kinases in plant reproduction
3. 学会等名 International Symposium on Plant Receptor Kinases and Cell Signaling 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Key signalling molecules in plant reproduction: Re-discovery of a reproductive hormone
3. 学会等名 Woolhouse Lecture of John Innes Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Key signalling molecules in pollen tube guidance
3. 学会等名 Symposium Down Under: Mechanisms controlling plant reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 時田公美、上田彩果、北野浩之、伊藤英人、佐藤綾人、鈴木孝征、中野雄司、伊丹健一郎、東山哲也
2. 発表標題 シロイヌナズナの有性生殖の ために雌雄細胞を活性化する鍵分子
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 花粉管成長調節剤	発明者 東山哲也、時田公美、伊丹健一郎、上田彩果、他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-046297	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松浦 - 時田 公美 (Matsuura-Tokita Kumi) (50415296)	名古屋大学・大学院理学研究科・研究員 (13901)	