

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15817

研究課題名(和文)花粉管の先端成長を制御するシグナル伝達の分子基盤と調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular basis that modulates signal transduction for the tip growth of the pollen tube

研究代表者

武内 秀憲 (Takeuchi, Hidenori)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教

研究者番号：10710254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の有性生殖の達成には、花粉管の細胞自律的な「伸長」と雌のシグナル分子への「誘引(伸長方向の制御)」の調節が必要である。本研究では、低分子量GTPaseタンパク質ROPのシグナル伝達に着目し、花粉管の伸長・誘引が統合的に調節される分子機構の解明を目指した。ROP活性化因子であるROPGEFsの局在解析や多重遺伝子破壊株の表現型解析を行い、複数のROPGEFが花粉管の各挙動およびステージごとに使い分けられることが、連続的な花粉管の伸長・誘引に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉管の伸長・誘引は、被子植物が有性生殖を成功させ、種子や果実を实らせるために必須である。本研究では、この過程の制御に関わる因子を発見し、作動メカニズムを理解した。また、花粉管の先端成長の様式は、動物を通じて広く見られる仕組みであり、細胞の挙動調節の共通性の理解にも寄与した。本研究の成果は、被子植物の生殖の仕組みの一端を明らかにしただけでなく、将来的に種子・果実の生産性を操作する技術の開発にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：For successful sexual reproduction in flowering plants, the tip-growing pollen tube is modulated by mechanisms of cell-autonomous "elongation" and female molecule-controlled "attraction". In this study, we analyzed molecular mechanisms that integrally regulate pollen tube elongation and attraction by focusing on molecular signaling through the small GTPase protein ROP. Localization and mutant analyses for pollen-expressed ROPGEFs, which activate ROP, indicated that multiple ROPGEFs are utilized for each behavior and stage of the pollen tube and modulate continuous and balanced elongation and attraction of the pollen tube tip.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：受容体シグナリング 花粉管 先端成長 シロイヌナズナ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 被子植物の有性生殖において、花粉管の先端成長は受精達成のために必須の仕組みである。花粉管は細胞自律的に「伸長」するが、雌しべ組織からのシグナル分子を感知して伸長方向を調節する「誘引」の仕組みも携えている。我々は、分泌性の花粉管誘引ペプチド AtLURE1、およびその受容体である PRK6 (pollen-specific receptor kinase 6) を同定し、AtLURE1-PRK6 シグナリングが花粉管の誘引を制御することを明らかにしてきた (Takeuchi and Higashiyama, *PLoS Biol*, 2012; *Nature*, 2016; Zhang et al, *Nat Commun*, 2017)。さらに、PRK6 は他の PRK ファミリーの受容体と協調してはたらき、花粉管の伸長そのものの制御にも関与する。

(2) PRK ファミリーの受容体は、Rho タイプの低分子量 GTPase である ROP (Rho of plant) のシグナリングに関与することが示唆されてきた (Zhang and McCormick, *PNAS*, 2007; Chang et al, *Mol Plant*, 2013)。実際に、PRK6 を含む PRK ファミリーの受容体は ROP 活性化因子である ROPGEF (ROP guanine nucleotide exchange factor) と相互作用する (Takeuchi and Higashiyama, *Nature*, 2016; Yu et al, *Sci China Life Sci*, 2018)。しかしながら、花粉管の伸長や誘引 (伸長の方向制御) における ROPGEF-ROP シグナリングの重要性ははっきりしておらず、その分子シグナリングが駆動し調節されるための仕組みは明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 花粉管伸長のマスタースイッチとしてはたらく ROP タンパク質のシグナリングに着目し、PRK 受容体-ROPGEF による ROP シグナリングの調節機構を解析することで、花粉管の連続的な伸長を支える分子機構の理解を目指した。

(2) 花粉管誘引ペプチド AtLURE1-受容体 PRK6 シグナルが ROPGEF-ROP 経路をどのように変調しているのかを調べることで、花粉管の誘引応答に関わる細胞内シグナリングの理解を目指した。また、AtLURE1-PRK-ROPGEF-ROP シグナリングに関わる構成因子の包括的な把握を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの花粉管で発現する五つの ROPGEF 遺伝子 (ROPGEF8, 9, 11, 12, 13) を破壊した *ropgef* 五重変異体を用い、花粉を直接培地上に撒いて発芽させる条件 (*in vitro*)、花柱を通して培地上を伸長させる条件 (*semi-in vivo*)、雌しべの生体内条件 (*in vivo*) の各条件での花粉管の表現型を観察した。さらに、蛍光タンパク質を融合させた各 ROPGEF および変異型 ROPGEF を *ropgef* 五重変異体に導入し、相補性と同在の解析を行った。

(2) *ropgef* 五重変異体や変異型 ROPGEF 導入株の花粉管に対し、AtLURE1 ペプチドによる花粉管誘引アッセイおよびウェーブービー応答アッセイを行い、ROPGEF による ROP シグナリングの調節機構を調べた。このとき、活性化 ROP や花粉管の伸長に関わる因子の蛍光標識株を組み合わせ、それらの分子ダイナミクスをライブイメージング解析した。また、その他の花粉管の制御因子候補に対しても変異体を作成し、同様の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの *ropgef* 五重変異体の花粉は、*semi-in vivo* および *in vivo* 条件では雌しべの柱頭で発芽し、花粉管の伸長が数割程度低下しているだけであった。継続的な花粉管伸長には、活性化した ROP の花粉管先端部への局所的な蓄積と側方部での不活性化のサイクルが重要であることが知られており、ROP の活性化効率が著しく損なわれている *ropgef* 五重変異体では花粉管の伸長効率が損なわれたと考えられる。一方で、*in vitro* 条件では花粉はほとんど発芽しなかった (発芽率 3%、野生型は 80%以上)。また、花粉管誘引アッセイおよびウェーブービー応答アッセイにおいて、*ropgef* 五重変異体の花粉管は AtLURE1 ペプチドにほとんど応答しなかった。これらの結果から、ROPGEF による ROP の活性化は、花粉管が迅速に伸長方向を決定する際 (発芽時や外部シグナルへの応答時) に特に重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) *ropgef* 五重変異体の相補実験により、花粉管の制御の各段階における各 ROPGEF の機能を解析した。その結果、ROPGEF8 と 9 が花粉発芽および効率的な花粉管伸長に、ROPGEF12 が AtLURE1 ペプチドへの応答を主に担っているという機能分担が明らかとなった。興味深いことに、単一の ROPGEF によって花粉発芽が回復したこれらの相補株において、発芽した花粉管は早期に破裂してしまう様子が観察された。ROPGEF は花粉管の破裂を抑制する CrRLK1L ファミ

リーの受容体シグナリングにも関与することが報告されている (Zhou et al, *Dev Cell*, 2021)。本研究の結果より、花粉管の ROPGEF は伸長と誘引の制御だけでなく破裂の制御も担っており、各 ROPGEF がオーバーラップしながらも異なる花粉管の挙動を分担して調節することで、伸長・誘引・破裂のバランスが維持されていることが初めて明示された。

(3) 花粉管の各挙動の制御に比較的大きな寄与を示した ROPGEF8 を用いて、GEF 活性をもつ PRONE ドメイン、N 末端ドメイン、C 末端ドメインのそれぞれの機能を相補実験により調べた。semi-*in vivo* 条件における花粉管の伸長促進には C 末端ドメインが必要であることが示された。C 末端ドメインは PRK6 を含むいくつかの PRK 受容体との相互作用に重要であることが先行研究で示されている (Zhang and McCormick, *PNAS*, 2007; Takeuchi and Higashiyama, *Nature*, 2016; Yu et al, *Sci China Life Sci*, 2018)。ROPGEF は C 末端を介して PRK 受容体と相互作用することで花粉管先端の細胞膜近傍へとリクルートされ、効率的に花粉管伸長を促進するという仕組みが予想された。一方で、花粉発芽の促進には PRONE ドメインのみで十分であったため、発芽時 (伸長端が決定する前) においては ROPGEF の細胞膜近傍へのリクルートは異なる仕組みでなされている、あるいは必要ない可能性が示唆された。さらに興味深いことに、N 末端ドメインを欠く ROPGEF8 を導入した *ropgef* 五重変異体の花粉管は AtLURE1 への応答性をあまり回復しなかった。今後、花粉管伸長ならびに誘引ペプチド AtLURE1 への応答のダイナミクスの詳細をライブ解析し、これらドメインの機能や花粉管の伸長・誘引の制御のバランスを捉えることで、花粉管の制御アルゴリズムを数式化し理解する必要があると考えられる。

(4) ROPGEF8、9、12 の局在を蛍光観察したところ、花粉管が伸長時に形を変えていくごく先端部 (“伸長ドーム”と定義) への集積が見られた。(3) 同様に ROPGEF8 に関して、各ドメインの重要性を観察したところ、C 末端ドメイン欠損型の ROPGEF8 は伸長ドームへの集積が見られなかった。上述の花粉管の伸長実験の結果とあわせて、C 末端ドメインを介した伸長ドームへの集積が花粉管の効率的な伸長に重要であることが示唆された。活性化 ROP マーカーや PRK6 の局在と比較すると、この伸長ドームへの局在はより先端の一部に限定されたものであった。このため、花粉管においては C 末端ドメインを介した ROPGEF と PRK 受容体との相互作用は何らかの仕組みで調節されていると予想される。今後、まずは ROPGEF の伸長ドームへの限局に PRK 受容体が関わっていることを調べるため、*prk* 多重変異体に対して C 末端欠損型の ROPGEF8 の導入を完了している。また、各変異型 ROPGEF8 導入株に活性化 ROP マーカーやアクチンマーカーを導入することで、ROP シグナリングのダイナミクスと ROPGEF ドメインの調節機能の解明が期待される。

本研究により、ドミナントネガティブ型や恒常活性型 ROP の一過的発現実験の結果のみから議論されてきた花粉管 ROP およびその調節因子 (ROPGEF 等) の機能が、機能欠損変異体を用いた解析により初めて明らかとなった。各種株の詳細な解析を通じて、ROPGEF によって精細に変調される花粉管の機能のマスタースイッチ ROP シグナリングの駆動メカニズムの一端が示された。花粉管で発現する全ての ROPGEF を失っても花粉管の伸長・誘引の効率が多少減少するだけという本研究の結果は我々の当初の予想に反するものであったが、被子植物が獲得した花粉管を用いた生殖戦略の精密性と頑健性を物語っている。また、花粉管の伸長・誘引を制御する PRK ファミリーの受容体シグナリングと破裂を制御する CrRLK1L ファミリーの受容体シグナリングの両方が ROPGEF を介することが、花粉管の挙動の変調の鍵であることが本研究により示唆された。今後、本研究で見出したさらなる花粉管の細胞内構成分子にも焦点を当てながら PRKs/CrRLK1Ls-ROPGEFs-ROPs シグナリングを調べていくことで、被子植物に繁栄をもたらした花粉管による生殖の原理を解明し、種子・果実の生産性の制御技術開発にもつなげていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Motomura Kazuki, Takeuchi Hidenori, Notaguchi Michitaka, Tsuchi Haruna, Takeda Atsushi, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Persistent directional growth capability in Arabidopsis thaliana pollen tubes after nuclear elimination from the apex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22661-8	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 Takeuchi Hidenori	4. 巻 142
2. 論文標題 The role of diverse LURE-type cysteine-rich peptides as signaling molecules in plant reproduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2021.170572	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 Nagae Takuya T., Takeuchi Hidenori, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Quantification of Species-Preferential Micropylar Chemoattraction in Arabidopsis by Fluorescein Diacetate Staining of Pollen Tubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052722	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 Susaki Daichi, Izumi Rie, Oi Takao, Takeuchi Hidenori, Shin Ji Min, Sugi Naoya, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Kawashima Tomokazu, Maruyama Daisuke	4. 巻 35
2. 論文標題 F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in Arabidopsis synergid cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac371	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井本美紀, 長江拓也, 内木希美, 東山哲也, 武内秀憲
2. 発表標題 花粉管受容体ファミリーによる極性成長の協調的制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長江拓也, 内木希美, 井本美紀, 永原史織, 東山哲也, 別所-上原奏子, 武内秀憲
2. 発表標題 被子植物の花粉管受精を革新した受容体モジュールの同定
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内木希美, 東山哲也, 武内秀憲
2. 発表標題 シロイヌナズナの花粉管伸長及び誘引におけるRopGEFの解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武内秀憲, 別所-上原奏子, 長江拓也, 井本美紀, 内木希美, 永原史織, 水多陽子, 東山哲也
2. 発表標題 雌しべの中の道標を辿る花粉管の旅: 被子植物が獲得したPRKファミリー受容体の機能
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長江拓也, 武内秀憲, 水多陽子, 東山哲也
2. 発表標題 アブラナ科植物の花粉管誘導過程における異種と同種を見分ける認証機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内木希美, 東山哲也, 武内秀憲
2. 発表標題 受容体シグナリングの活性化因子RopGEFを介した花粉管機能の制御機構の解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	内木 希美  (Naiki Nozomi)	名古屋大学  (13901)	
研究協力者	長江 拓也  (Nagae Takuya)	名古屋大学  (13901)	
研究協力者	永原 史織  (Nagahara Shiori)	名古屋大学  (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------