

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770041

研究課題名（和文）

種の維持に関わる花粉管ガイダンスの分子基盤—花粉管誘引因子と受容体の分子進化—

研究課題名（英文）

Molecular evolutionary basis of pollen tube guidance mechanism for species recognition and fertilization

研究代表者

金岡 雅浩 (KANAOKA MASAHIRO)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：10467277

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物の受精において重要な役割を果たす花粉管ガイダンス因子 LURE が植物種間でどのように異なっているかを調べた。LURE1 タンパク質をコードする遺伝子はトレンニア同族内の植物で保存されていたが、アミノ酸配列は異なっていた。それぞれの種から得られた LURE1 タンパク質は、他種の花粉管より同種の花粉管をより強く誘引した。本研究より、LURE の多様化が異種間での受精を防ぐメカニズムの一因と成っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Here I investigated the molecular diversity of LURE, which is important for pollen tube guidance in *Torenia*. LURE1 orthologues were conserved in the *Torenia* species, but its protein sequences were diverged. LURE1 proteins attracted pollen tubes in a species-specific manner, suggesting that the diversification of pollen tube guidance molecules is one of the mechanism to prevent interspecific crosses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物発生生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物生理学

キーワード：花粉管ガイダンス、種分化、植物有性生殖、トレンニア、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物の受精において、花粉管はめしべ内部を伸長し、最終的には胚珠の珠孔へと迷うことなく到達して胚嚢内に進入する。多くの植物では1つのめしべの中に数十から数百もの胚珠が作られ、その1つ1つに精確に花粉管が導かれる。このように花粉管をその標的まで精確に導く機構を花粉管ガイダンスと呼ぶ。申請者の所属する研究室では、胚嚢が胚珠組織から飛び出しているユニークな植物トレンニア (*Torenia fournieri*) を用いて、胚

珠と花粉管の両者を同時に培養することにより、花粉管ガイダンスを *in vitro* で再現することに成功した。胚嚢細胞のレーザー除去実験より、助細胞から花粉管誘引シグナルがでていることが明らかになった。また、*T. fournieri* とその近縁種4種を用いた *in vitro* 花粉管ガイダンス実験より、5つの種全てで胚嚢への花粉管の誘引には助細胞が必要であり、花粉管は同種の胚嚢にのみ誘引されるという、種特異性があることがわかった。このことは、花粉管ガイダンスが、同種

内での交配を保証し、他種との交雑を防ぐという、「種の維持」の根本に関わる重要なメカニズムであることを示している。近年、*T. fournieri* の助細胞のみを単離して作成したcDNA ライブラリーの解析から、助細胞特異的に発現している約 7kDa の分泌型低分子ペプチドをコードする遺伝子 *TfCRP1*, *TfCRP3* がみつかった。精製された *TfCRP1*, *TfCRP3* タンパク質が花粉管誘引活性を示すこと、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた両タンパク質の翻訳阻害により花粉管が胚珠に誘引されなくなることから、*TfCRP1*, *TfCRP3* が花粉管ガイダンス分子の実体であると示された (以下、助細胞で発現し花粉管誘引活性をもつ *TfCRP1* タイプの分子のことをまとめて **LUREs** と表記する)。しかしながら、他種植物からの **LUREs** オーソログの単離はなされておらず、**LUREs** が普遍的な花粉管ガイダンス因子であるかは明らかになっていない。また、花粉管に存在すると考えられている **LUREs** の受容体も、同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、*T. fournieri* とその近縁種を用いることにより、(1) **LUREs** 相同遺伝子を用いた花粉管誘引活性の測定と分子進化の解明、(2) **LURE** の花粉管ガイダンス活性における機能ドメインの同定、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Torenia fournieri* とその近縁種から **LUREs** 相同遺伝子を単離し、その配列を種間で比較した。各植物種由来の **LUREs** 相同遺伝子からタンパク質を発現・精製し、*in vitro* 花粉管ガイダンスアッセイ実験を行い、花粉管ガイダンス物質として機能するか確認した。同時にこれらの植物の詳細な系統樹も作成し、**LUREs** の分子進化と系統関係も考察した。(2) 精製 **LURE** タンパク質を用いた *in vitro* 花粉管ガイダンスアッセイを同種の花粉管に対してのみならず他種の花粉管に対しても行い、この分子の違いで花粉管誘引に差が見られるか検討した。

4. 研究成果

(1) 近年当研究室の研究により明らかとなった、*Torenia fournieri* における花粉管ガイダンス因子 *TfCRP1* のオーソログ遺伝子を近縁植物から単離することに成功した。組織別 RT-PCR の結果、近縁種 *T. concolor* の胚珠 cDNA から単離された *TcCRP1* 遺伝子は植物体では胚珠のみ、さらに胚珠の中では単離助細胞 cDNA において強く発現していた (図 1)。このことから *TcCRP1* が花粉管誘引物質として働く可能性が示唆された。*TcCRP1* タン

パク質を *T. concolor* の花粉管に与えたところ、花粉管を誘引する活性を持つことが分かった (図 2)。さらに、その活性は *TcCRP1* タンパク質の濃度依存的であることも明らかになった。また、*CRP1* 遺伝子の系統樹をアミノ酸置換の速度を考慮して作成したところ、*T. fournieri* ともっとも近縁な *T. violacea* が 1 つのグループになり、それ以外の種とは分かれること、シグナルペプチドをコードする領域は高度に保存されていたが成熟タンパク質をコードする領域は正の選択を受けている可能性が示唆された。

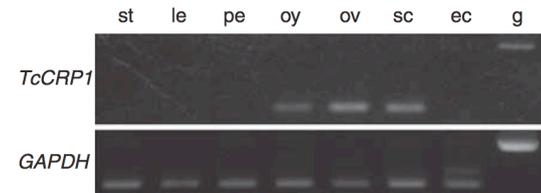


図 1. *TcCRP1* 遺伝子の発現解析

TcCRP1 は助細胞を含む組織である胎座や胚珠で強く発現していた。また、配偶体内においては卵細胞では発現せず、助細胞のみで発現していた。st は茎、le は葉、pe は花弁、oy は胎座、ov は胚珠、sc は助細胞、ec は卵細胞由来の cDNA を用いたことを、それぞれ表す。また g はゲノム DNA を表す。

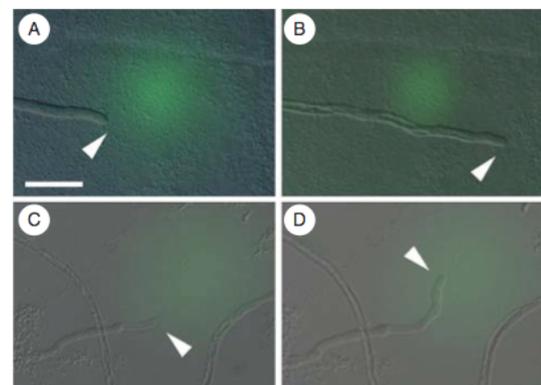


図 2. *TcCRP1* タンパク質は花粉管ガイダンス活性を示す

A はバッファーのみを与えた直後の花粉管、B はその 20 分後を示す。花粉管は直線的に伸長し続け、バッファーには誘引されない。C は *TcCRP1* タンパク質を与えた直後の花粉管を、D はその 20 分後を示す。花粉管は *TcCRP1* タンパク質を置いた領域 (緑色) に向かっていく。

(2) *TcCRP1* と *Lindernia micrantha* から単離された *LmCRP1* の成熟ペプチド配列クローニングし、大腸菌を用いてタンパク質を発現させた。リフォールディングした精製タンパク質を用いて *T. fournieri* の花粉管に対して誘引アッセイを行ったところ、

TcCRP1はTfCRP1よりは弱いもののある程度の誘引活性を示した。それに対し、LmCRP1はまったく誘引活性を示さなかった。さらに、TfCRP1タンパク質の*T. concolor*花粉管に対する誘引活性は同種の花粉管に対する物よりも低いことも明らかになった。TcCRP1は8アミノ酸、LmCRP1は15アミノ酸がそれぞれTfCRP1と異なっていることから、これらのアミノ酸の違いが花粉管における認識に関わっている可能性が示唆された。また、CRP1タンパク質のどのような構造によりこのような種特異性がみられるのか明らかにするため、NMRを用いたタンパク質の立体構造の決定を試みた。15Nで標識したリコンビナントTfCRP1タンパク質に花粉管誘引活性があることを確認した後、1H-15N HSQCにより解析したところ、TfCRP1のアミノ酸数とほぼ同じ数のシグナルが認められた。

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)

- ①Lee, JS., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, MM., McAbee, JM., Sarikaya, M., Tamerler, C., Torii, KU. (2012) "Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning". *Genes & Development*, 査読有, 26, 126-136.
- ②Xie, B., Deng, Y., Kanaoka, MM., Okada, K., Hong, Z. (2012) "Expression of *Arabidopsis* callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration". *Plant Science*, 査読有, 183, 1-8.
- ③Kanaoka, MM., Kawano, N., Matsubara, Y., Susaki, D., Okuda, S., Sasaki, N., Higashiyama, T. (2011) "Identification and characterization of TcCRP1, a pollen tube attractant from *Torenia concolor*". *Annals of Botany*, 査読有, 108: 739-747.
- ④Kanaoka, MM. (2011) "Isolation of Intact Gametophytic Protoplasts from *Torenia* and *Lindernia* Species." *Cytologia*, 査読有, 76: 109-110.
- ⑤Kawano, N., Susaki, D., Sasaki, N., Higashiyama, T., Kanaoka, MM. (2011) "Isolation of gametophytic cells and identification of their cell-specific markers in *Torenia fournieri*, *T. concolor* and *Lindernia micrantha*" *Cytologia*, 査読有, 76: 177-184.
- ⑥Nishida, S., Takakura, K-I., Nishida, T., Matsumoto, T., Kanaoka, MM. (2011) "Differential effects of reproductive interference by an alien congener on native *Taraxacum* species" *Biological Invasions*, 査読有, 10.1007/s10530-011-0088-6.
- ⑦Itoh K., Izumi A., Mori T., Dohmae N., Yui R., Maeda-Sano K., Shirai Y., Kanaoka, MM., Kuroiwa T., Higashiyama T., Sugita M., Murakami-Murofushi K., Kawano S., *Sasaki N. (2011) "DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*." *Mitochondrion*, 査読有, 11: 575-586.
- ⑧Hamamura Y., Saito C., Awai C., Kurihara D., Miyawaki A., Nakagawa T., Kanaoka, MM., Sasaki N., Nakano A., Berger F., *Higashiyama T. (2011) "Live-cell Imaging Reveals the Dynamics of Two Sperm Cells during Double Fertilization in *Arabidopsis thaliana*." *Current Biology*, 査読有, 21: 497-502.
- ⑨Kanaoka, MM., Torii, KU. (2010) "FERONIA as an upstream receptor kinase for polar cell growth in plants."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読無
(invited review), 107: 17461-17462.

- ⑩Guseman, JM., Lee, JS., Bogenschutz, NL., Peterson, KM., Virata, RE., Xie, B., Kanaoka, MM., Hong, Z., *Torii, KU. (2010) "Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8)." *Development*, 査読有, 137: 1731-1741.
- ⑪金岡雅浩、東山哲也 (2009)「花粉管ガイダンス物質の同定と種間多様性」ブレイン・テクノニュース、査読無(invited review), vol. 135, pp. 16-20.
- ⑫東山哲也、奥田哲弘、筒井大貴、椎名恵子、武内秀憲、金岡雅浩、佐々木成江 (2009) 「花粉管誘引物質ルアーの発見」化学と生物、査読無(invited review), vol.47、pp. 617-623

[学会発表] (計 7 件)

- ①金岡雅浩「Molecular Characterization of Pollen Tube Guidance and Its Species-specificity in *Torenia*」 8th Okazaki Biological Conference、2012 年 3 月 21 日、岡崎カンファレンスホール
- ②金岡雅浩「胚珠に由来する新規花粉管ガイダンス因子の探索」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学
- ③金岡雅浩「トレンニア近縁種における花粉管誘引物質の同定と解析」日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 17 日、東京大学
- ④金岡雅浩「花粉管誘引物質の種間多様性とその機能」第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 21 日、東北大学 (震災のため大会中止、要旨集の発行をもって発表は成立した)

- ⑤金岡雅浩「Molecular diversification of Cysteine-Rich Polypeptides and their functions for pollen tube guidance in *Torenia*。」BMB2010、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド
- ⑥金岡雅浩「胚珠に由来する新規花粉管ガイダンス因子の探索」第 4 回生殖研究ワークショップ、2010 年 8 月 20 日、筑波大学 下田臨海実験所
- ⑦金岡雅浩「花粉管誘引物質 LUREs の種間多様性」第 51 回日本植物生理学会年会 2010 年 3 月 20 日、熊本大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金岡 雅浩(KANAOKA MASAHIRO)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号:10467277

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし