

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370018

研究課題名(和文)花粉の表層構造エキシンおよびポレンコートの形成機構と受粉過程における機能の解析

研究課題名(英文) Molecular genetic studies on the construction of pollen surface structures and their function for pollination

研究代表者

石黒 澄衛 (Ishiguro, Sumie)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50260039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：エキシンは花粉の表層にある硬くて化学的にも安定な構造で、花粉を保護する働きがある。エキシンの立体構造が壊れるシロイヌナズナの突然変異体kaonashiを多数見出し、そのうち12個の遺伝子を同定して、エキシンの形成にはキシランなどの多糖が必要であることを明らかにした。一方、ポレンコートはエキシンを覆う粘着物質である。ポレンコートの主要タンパク質であるEXLとGRPがいずれも花粉の稔性に重要な役割を持つことを示した。さらに、柱頭に接着した花粉のポレンコートの挙動をライブイメージングで観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Exine, a rigid and chemically stable architecture on the surface of pollen grains, serves a protector of male gametes. We identified many Arabidopsis kaonashi mutants that produce pollen grains with abnormal exine structure. Twelve responsible genes of the mutants determined in this study revealed that a certain class of polysaccharides plays important roles for exine construction. Pollen coat consisting mainly of proteins and lipids is another surface component of pollen grains. Biosynthesis and requirement of two major proteins, EXL and GRP, in Arabidopsis pollen coat were analyzed. We also visualized the process of pollen coat formation in anthers and its behavior on the surface of stigmatic papilla cells.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 生殖 花粉 細胞壁 イメージング 高速シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

花粉の表面はエキシンと呼ばれる強固な殻で覆われており、その構造は植物種ごとに異なる特徴的なものである。ユリやシロイヌナズナのような網目状構造を持つものが多いが、筋状に見えるもの(バラ科)、多数の突起を持つもの(キク科)、複層構造のもの(イネ科)などエキシンの構造は多様である。エキシンの形成に必要な遺伝子は2010年頃までは主に発生過程で花粉が崩壊する雄性不稔性突然変異の原因遺伝子として同定されていた。その多くは生合成酵素であり、欠損するとエキシン全体を欠いてしまうような表現型になる。これらの解析から、スポロポレニンという名前はあるが正体不明だったエキシンの構成物質は中鎖脂肪酸、ポリケチド、フェニルプロパノイドなどの重合物であると考えられるようになった。しかし、前述のような複雑なエキシンの立体構造をどのようにして作るのかという点に関しては、電子顕微鏡観察による知見はあったものの、遺伝子の同定は進んでいなかった。我々は走査型電子顕微鏡で花粉を1個ずつ観察する方法でエキシンの構造が異常になるシロイヌナズナの突然変異体をスクリーニングし、*kaonashi* (顔なし, *kns*) と名づけて報告した。これらの原因遺伝子を同定しその機能を解明することで、複雑な構造を持つエキシンの構築のしくみが明らかになると期待された。

多くの花粉では、エキシンの外側をポレンコートと呼ばれる粘着質が覆っている。網目状や多孔質のエキシンを持つ花粉が多いのは、ポレンコートを保持するのに有利であるためであろう。アブラナ科では自家不和合性をもたらす物質がポレンコート中のペプチドであることが証明され、ポレンコートは乾燥の防止や送粉者への接着だけでなく花粉と柱頭との認識反応にも関わることが明らかになった。おそらく種間認識に関わる物質も主にポレンコートに存在すると推定されるが、どんな物質かは全くわかっていない。そもそもポレンコートにはどのような物質が存在するのか、各構成成分はどの細胞でどのようなしくみで作られるのか、よくわかっていないことは多かった。アブラナ科ではタペート細胞にエライオプラストおよびタペートソームと呼ばれる二種類の脂質蓄積性オルガネラが発達し、前者はステロールエステル、後者は高級炭化水素とGRPと呼ばれる数種のタンパク質を蓄積している。そして、タペート細胞の崩壊に伴ってこれらのオルガネラが細胞表面に蓄積し、ポレンコートになることが示されている。しかし、この二つのオルガネラの働きだけでポレンコート成分の生合成を説明できるほど単純なものだと考えられていたわけではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに同定した *kns* 突然変異体を材料に、高速シーケンサを利用して

その原因遺伝子を同定し、明らかになった遺伝子の機能からエキシンの立体構造の構築機構を解明することを目的とする。また、ポレンコートのさまざまな構成成分がどのようなしくみで合成され、どのようにして花粉表面に運ばれるのか、それらは受粉においてどのような機能を持つのか、明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *kns* の原因遺伝子の同定

突然変異体からゲノムDNAを調製し、高速シーケンサを用いて全ゲノムの塩基配列を決定した。野生型株との比較により突然変異を持つ遺伝子を原因遺伝子として同定した。他のアレルとの交配または野生型遺伝子の遺伝子導入によって相補性試験を行った。

(2) ポレンコート成分の同定と解析

シロイヌナズナの花粉からポレンコートを調製し、タンパク質についてはTOF-MSで、低分子化合物についてはLC-MSおよびGC-MSで分析して成分を同定した。タンパク質成分のうち特にEXLに注目し、タペート細胞内における蓄積場所や受粉における必要性について解析した。

(3) ポレンコートの形成過程および柱頭上での挙動のライブイメージング

タペートソームの主要構成タンパク質であるGRP17にGFPを連結してタペート細胞で発現させ、タペート細胞が崩壊してポレンコートになる過程、および乳頭細胞に置かれた花粉からポレンコートが乳頭細胞に向かって移動する様子を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) *kns* の原因遺伝子を同定した

これまでのスクリーニングで同定した *kns* 突然変異体はいずれもシロイヌナズナの Ler 株に由来し、化学変異剤(メタンスルホン酸エチル)または放射線(ガンマ線や速中性子線)処理で作られたものである。本研究を開始した頃はまだマップベースクローニング法(クロモソームウォーキング法)が主流であったが、未同定の多数のKNS原因遺伝子を効率よく同定するため、高速シーケンサを用いて遺伝子を同定する方法の確立を目指すことにした。高精度の野生型ゲノムデータが公開されているシロイヌナズナでは、高速シーケンサを使えば突然変異を検出すること自体は容易である。むしろ問題は、突然変異処理によってゲノム中に生じた多数の変異の中から、どれが標的遺伝子の変異なのかを選び出すことにあった。そこで、突然変異の検出と標的遺伝子座のマッピングを同時に行うことにした。*kns* 突然変異体を同じシロイヌナズナの Col-0 株と交配し、F2 世代で変異型表現型を示した個体を20個体集めた。各F2個体の自殖種子(F3)を20個ずつ計400

個播種し、全部の芽ばえを混合して DNA を調製した。これを高速シーケンサで解析し、Ler ゲノムの割合が 100%の領域内にある突然変異のみを候補として選び出した。確認は相補性試験で行った。この方法で *KNS3*, *KNS6* など 10 個の *kns* 原因遺伝子の同定に成功した。

(2) エキシンの形成にはアラビノガラクトンが必要であることがわかった

エキシンが薄くなる突然変異体 *kns4* の原因遺伝子を同定し、それが多糖の一種であるアラビノガラクトンの生合成酵素の遺伝子であることを明らかにした。*kns4* の発達初期の花粉を調べると、野生型と比べてアラビノガラクトンが著しく減少していた。この時、ペクチンの量も減少していたことから、アラビノガラクトンは花粉表面にペクチン層が形成される際の足場になっていると推定した。両層の形成がエキシンを厚く発達させるために重要であることがわかった。

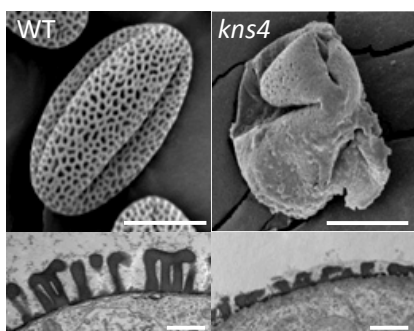


図1 野生型と *kns4* の花粉の表現型

(上)走査型電子顕微鏡で観察したエキシンの構造。(下)透視型電子顕微鏡で観察したエキシンの断面。*kns4* のエキシンは野生型の半分以下の厚さしかない。スケールバーはそれぞれ 10 μm および 1 μm 。

(3) エキシンの形成にはキシランが必要であることがわかった。

網目が野生型よりも細くなる突然変異体 *kns6* の原因遺伝子は糖転移酵素をコードしており、キシランの生合成に関与すると推定された。GFP 融合タンパク質を用いた解析から、*KNS6* はゴルジ体に局在することが確認できた。花粉の表面を調べてみると、野生型の花粉にはキシランが認められたが、*kns6* の花粉はそれを欠いていた。*kns6* とよく似た表現型を示す *kns37* の原因遺伝子も糖転移酵素をコードしており、変異体は花粉表面のキシランが減少していた。キシランはエキシンの形成に重要な働きをしていることがわかった。

(4) エキシンの形成にはカロースが必要であることがわかった

減数分裂直後の花粉はしばらくの間カロースの壁に取り囲まれて発達する。花粉四分子と呼ばれ、この時期にエキシンの形成も開始されることから、カロースはエキシン形成

に何らかの役割を持つ可能性が高い。実際に、得られた突然変異体のうち *kns19* はカロース合成酵素の遺伝子であり、花粉四分子はカロースを欠いていた。*kns20* はカロース壁が薄くなり、エキシン同士が接着する表現型が観察された。*kns23* の原因遺伝子はカロース分解酵素の遺伝子であり、エキシンの網目の一部が欠損する表現型を示した。

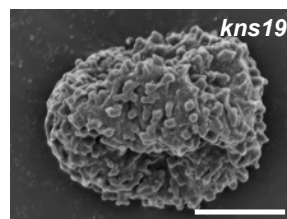


図2 カロース合成酵素の突然変異体 *kns19* 走査型電子顕微鏡で見た *kns19* の花粉。エキシンの構造が大きく崩れている。スケールバーは 10 μm 。

(5) ポレンコートの主要タンパク質 EXL は花粉の機能に必須であることがわかった

シロイヌナズナのパレンコートには GRP および EXL と呼ばれる二つのタイプの主要タンパク質がある。いずれもタペート細胞で作られ、GRP はタペートゾームに高級炭化水素とともに蓄積することがわかってきた。EXL の蓄積場所を調べてみたところ、小胞体に蓄積していることがわかった。EXL を欠損させると花粉の稔性が低下し、GRP とともに欠損させるとさらに稔性が低下した。EXL も GRP も柱頭による花粉認識に必須であることが明らかになった。

(6) ポレンコートの形成とその受粉時の挙動をライブイメージングすることができた

GRP17 に GFP を連結してタペート細胞を可視化し、葯内での挙動を観察した。実験はセイヨウナタネで行った。その結果、タペート細胞は崩壊に先立ってまずプロトプラスト化し、葯壁から離れて葯室中（花粉と花粉の間）に侵入し、そこで破裂して内容物を放出し、周囲の花粉にポレンコートの原料として供給することがわかった。

雌しべの乳頭細胞に接着した花粉は乳頭

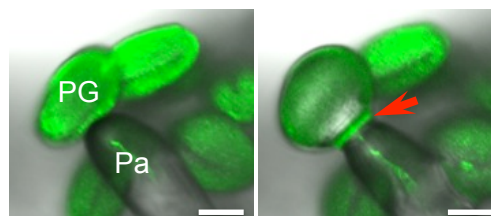


図3 GFP 蛍光による foot 構造の可視化

GRP17-GFP を遺伝子導入したシロイヌナズナの花粉はポレンコートが GFP の蛍光で可視化されている。この花粉 (PG) を乳頭細胞 (Pa) に置くと、10 分後には花粉と乳頭細胞の間にポレンコートが移動して foot 構造 (矢印) が形成される。スケールバーは 10 μm 。

細胞から水を供給されて膨らみ、発芽するが、このときポレンコートの一部が乳頭細胞との接地面に移動し、foot と呼ばれる水を通すための構造を作るといわれる。GRP17-GFP を発現するナタネはポレンコートも光るので、これを用いて受粉後のポレンコートの挙動を観察した。その結果、foot 構造の形成をライブイメージングすることに成功した。

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 7 件)

① Hironaka Tsukagoshi, Takamasa Suzuki, Kouki Nishikawa, Sakae Agarie, Sumie Ishiguro, Tetsuya Higashiyama RNA-Seq analysis of the response of the halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) to high salinity. *PLoS ONE* **10**, e0118339 (2015). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0118339

② Izabela Ruduś, Haruka Terai, Takafumi Shimizu, Hisae Kojima, Kazuki Hattori, Yuka Nishimori, Hironaka Tsukagoshi, Yuji Kamiya, Mitsunori Seo, Kenzo Nakamura, Jan Kępczyński, Sumie Ishiguro Wound-induced expression of *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* and *DAD1*-like lipase genes is mediated by both *CORONATINE INSENSITIVE1*-dependent and independent pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **33**, 849-860 (2014). 査読有 DOI: 10.1007/s00299-013-1561-8

③ Toshiya Suzuki, Sonomi Tsunekawa, Chie Koizuka, Kanta Yamamoto, Jun Imamura, Kenzo Nakamura, Sumie Ishiguro Development and disintegration of tapetum-specific lipid-accumulating organelles, elaioplasts and tapetosomes, in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Science* **207**, 25-36 (2013). 査読有 DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.02.008

[学会発表] (計 9 件)

① 石黒澄衛 「シロイヌナズナ *kaonashi4* 突然変異体の解析から見えてきた花粉エキシンの構築におけるアラビノガラクトサンとペクチンの役割」第 56 回日本植物生理学会年会 2015. 3. 16-18 東京農業大学(東京都・世田谷区)

② 速水彩子 「花粉エキシン構造の形成に関わるシロイヌナズナ *KAONASHI6* 遺伝子の

機能」第 55 回日本植物生理学会年会 2014. 3. 18-20 富山大学(富山県・富山市)

③ 西脇万理恵 「花粉表面のエキシン構造の形成と花粉四分子の分離に異常をきたすシロイヌナズナ *kaonashi20* 突然変異体のクローニング」第 54 回日本植物生理学会年会 2013. 3. 21-23 岡山大学(岡山県・岡山市)

④ 鈴木孝征 「高速シーケンサーを用いたシロイヌナズナ変異株の原因遺伝子同定システム Mitsucal の開発」第 54 回日本植物生理学会年会 2013. 3. 21-23 岡山大学(岡山県・岡山市)

⑤ 西脇万理恵 「花粉表面のエキシンの構造と花粉四分子の分離に異常をきたすシロイヌナズナの *kaonashi20* 突然変異体の解析」第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11-14 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

⑥ 石黒澄衛 「花粉壁の形態に異常を示す突然変異体 *kaonashi* のハイスループットクローニングの試み」公益財団法人科学技術交流財団研究会 2011. 12. 22 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

[その他]

ホームページ

<http://tabacum.agr.nagoya-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 澄衛 (ISHIGURO, Sumie)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：50260039

(2) 連携研究者

鈴木 孝征 (SUZUKI, Takamasa)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：50535797

(3) 研究協力者

鈴木 俊哉 (SUZUKI, Toshiya)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究員