

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570045

研究課題名(和文)陸上植物の雌雄細胞間コミュニケーションに共通する分子基盤の探索

研究課題名(英文) Investigation of communications in male and female gametophytic cells of land plants

研究代表者

金岡 雅浩 (Kanaoka, Masahiro)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10467277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1) *T. fournieri* とその近縁種 *T. concolor* から LUREs 相同遺伝子を単離し、その配列を種間で比較した。タンパク質間のドメインスワップ実験より *T. fournieri* の花粉管誘引において鍵となる領域を同定した。

(2) 新規に開発したマイクロ流体デバイスを用いて、*T. fournieri* より新規花粉管ガイダンス因子を同定した。

(3) ゼニゴケ *in vitro* 受精系の開発と精子誘引に関わる因子の探索をめざし、プレパレート上で精子の誘引をライブイメージングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：(1) LURE1 orthologue gene from *T. concolor* was isolated. pollen tube guidance assay using chimeric TfLURE1 and TcLURE1 identified important region for attraction in *T. fournieri*.

(2) A novel pollen tube attraction molecule was successfully identified by using a novel microfluidic pollen tube guidance system.

(3) a live imaging method for sperm attraction in *Marchantia polymorpha* was developed.

研究分野：植物生理発生学

キーワード：花粉管ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

花粉管はその伸長過程で、雌しべの様々な組織由来のシグナルを受けて伸長方向を変化させると考えられている。この花粉管を導くメカニズムを、花粉管誘引と呼ぶ。花粉管誘引には多段階のシグナルが関与していることがシロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から示唆されているが、その分子の実態の多くは明らかでない。

近年、*in vitro* 花粉管誘引実験系のモデル植物である *Torenia fournieri* から、助細胞で発現しシステインに富む分泌型ペプチド (CRP) をコードする遺伝子 *TfCRP* が複数単離された。それらの遺伝子産物のうち *TfCRP1*、*TfCRP3* タンパク質が花粉管誘引活性を持つことが示され、総称して LUREs と名付けられた (Okuda and Tsutsui et al., Nature, 2009)。申請者はさらに、*T. fournieri* の近縁種 *T. concolor* における誘引物質 *TcCRP1* を発見した。*TfCRP1*、*TcCRP1* はそれぞれ同種の花粉管をより強く誘引したが (Kanaoka et al., AoB, 2011) その選択性を担う分子機構は不明である。

苔類のゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の造精器に水分が付着すると、中から精子が放出される。精子は造卵器の入り口から内部に侵入し、卵細胞と受精する。スライドグラス上に造卵器と精子をおくと、精子が造卵器の方へと方向性を持って泳いでいく様子が観察された。このことより、花粉管を持たない種においても、雌の組織が精子の誘引に関わるのではないかと示唆されたが、その誘引に関わるメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

有性生殖とは、雌雄の異なる配偶体が融合して新たな個体が生じる受精様式である。被子植物では雌しべ組織からの誘引シグナルにより花粉管は胚のうへと導かれる。適切な雄と受精するために、誘引シグナルは種間で異なると考えられているが、その分子の実体は不明である。本研究では胚のうの助細胞より見いだされた誘引因子 LURE ペプチドの配列に種間多様性があることに着目し、どのアミノ酸が種認識の鍵となるか明らかにし、誘引シグナルを制御することにより生殖隔離の打破を目指す。また、花粉管を持たず精子が受精に関わるコケ植物ゼニゴケにおける精子誘引物質を同定し、これらの雄性配偶体誘引機構の共通性と多様性を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

・複数のトレニア属植物から単離された LURE 様遺伝子の配列を比較し、それぞれの間でアミノ酸を入れ替えたキメラタンパク質を作製する。これらキメラタンパク質を用いて花粉管誘引アッセイをおこない、花粉管誘引活性とアミノ酸配列との相関を解析する

ゼニゴケ *in vitro* 受精系の開発と精子誘引

に関わる因子の探索。

4. 研究成果

(1) *T. fournieri* とその近縁種 *T. concolor* から LUREs 相同遺伝子の単離を試みた。*TfCRP1* の相同遺伝子 *TcCRP1* はすでに単離されていたが (Kanaoka et al., 2011)、*TfCRP3* の相同遺伝子は *T. concolor* からは単離できなかった。*TfCRP3* ともっとも類似していた配列では成熟タンパク質をコードする部分に塩基置換によりストップコドンができていた。そのため *TfCRP3* に相当する遺伝子は *T. concolor* では偽遺伝子となっていると判断した。そこで CRP1 間の機能的差異に絞って解析を行うことにした。

TfCRP1 と *TcCRP1* では 8 アミノ酸がことなるので、タンパク質を N 末側・C 末側に分け 4 アミノ酸ずつを入れ替えたコンストラクトを作製した。それらキメラタンパク質を用いて花粉管誘引実験をおこなったところ、C 末側の領域が *TfCRP1* タイプだと *T. fournieri* の花粉管が有意に誘引されることが分かった。さらに、この 4 アミノ酸のうち特定のアミノ酸を含む領域が誘引に重要であることを示唆する結果も得られた。これらの結果より、*T. fournieri* の花粉管誘引において鍵となる領域が同定された。

(2) 花粉管の誘引を定量的に解析するために、新規にマイクロ流体デバイスを開発した (Horade, Kanaoka et al., 2013)。このデバイスを用いて、*T. fournieri* の胚珠から分泌される新規花粉管ガイダンス現象を解析した。生化学的な解析から、このガイダンスに関わる因子は新規のタンパク質であることが示唆された。各種カラムによる活性画分の分画と質量分析により、活性画分に含まれるタンパク質を複数同定した。リコンビナントタンパク質を作製しそれらのガイダンス活性を評価したところ、精製タンパク質のみで花粉管ガイダンス活性を示す新規のタンパク質が 1 つ見つかった。このタンパク質は新規の分泌タンパク質であり、アミノ酸配列には種間で大きな違いがあるものの基本的な構造は保存されていた。また、特に良く構造が保存されているタンパク質は被子植物 (花粉管を持つ植物) にのみ見出されたことから、このタンパク質の進化と花粉管の出現との間に何らかの関係があることが示唆された。この遺伝子は雌しべ組織内で発現していたが、タンパク質の局在は発現部位から予想されるよりも広範囲にわたっていた。このことから、この遺伝子産物が花粉管ガイダンスの最初に段階に必要となり、次に LURE により最終目的へと方向が調整される、という、複数の分子による多段階の花粉管ガイダンス機構が提唱された。

(3) ゼニゴケ *in vitro* 受精系の開発と精子誘引に関わる因子の探索をめざし、まず、精子の誘引のイメージングを試みた。プレパラート上で精子と造卵器を今日培養するこ

とにより、精子の誘引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6件)

- 1) Kaya H, Iwano M, Takeda S, Kanaoka MM, Kimura S, Higashiyama T, Abe M, Kuchitsu K. (2015) "Apoplasmic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in *Arabidopsis*" *Plant Signaling Behavior*, epub 2015/2/1. (査読有り)
- 2) Nishida S, Kanaoka MM, Hashimoto K, Takakura K-I, Nishida T. (2014) "Pollen-pistil interactions in reproductive interference: comparisons of heterospecific pollen tube growth from alien species between two native *Taraxacum* species" *Functional Ecology*, **28**, 450-457. (査読有り)
- 3) Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K. (2014) "Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth" *Plant Cell*, **26**, 1069-1080. (査読有り)
- 4) Horade M, Kanaoka MM, Kuzuya M, Higashiyama T, Kaji N. (2013) "A microfluidic device for quantitative analysis of chemoattraction in plants" *RSC Advances*, DOI: 10.1039/C3RA42804D (査読有り) (責任著者)
- 5) Okuda S, Suzuki T, Kanaoka MM, Mori H, Sasaki N, Higashiyama T. (2013) "Acquisition of LURE-binding activity at the pollen tube tip of *Torenia fournieri*." *Molecular Plant*, **6**, 1074-1090. (査読有り)
- 6) Peterson KM, Shyu C, Burr CA, Horst RJ, Kanaoka MM, Omae M, Sato Y, Torii KU. (2013) "Arabidopsis

homeodomain-leucine zipper IV proteins promote stomatal development and ectopically induce stomata beyond the epidermis." *Development*, **140**, 1924-1935.(査読有り)

[学会発表](計5件)

1. Kanaoka, M.M. Dynamics of stomatal behaviors and transcriptome in relation to environmental changes in Cardamine allotetraploid species, **Kyoto-Zurich Plant Workshop "Analyzing Plants in Complex Environments"**, Kyoto, Japan, 22 Dec 2014
2. Kanaoka MM, Kuzuya M, Higashiyama T. "Toward the understanding of pollen tube guidance and its species-specificity in *Torenia*" **第55回日本植物生理学会年会**、富山大学、2014年3月18日
3. Kanaoka MM. "Identification of a novel pollen tube attractant in *Torenia fournieri*" **International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014**, 名古屋大学、2014年9月9日
4. Kanaoka MM. "Sporophytic and gametophytic control of pollen tube guidance by secreted molecules" **38th Naito Conference**, 8 Oct 2014. (**ポスター発表賞受賞**)
5. Kanaoka M, Horade M, Kuzuya M, Higashiyama T, Kaji N. "Pollen Tube-in-a-Chip: A microfluidic device for quantitative analysis of pollen tube guidance" **23rd International Conference on Sexual Plant Reproduction, Porto, Portugal**, 14 July 2014

[図書](計3件)

- 1) Kanaoka MM. (2014) "Pollen tube

guidance toward the ovule" Atlas of Plant Cell Structure (Noguchi T, Kawano S, Tsukaya H, Matsunaga S, Sakai A, Karahara I, Hayashi Y. 編集、Springer) の一節として分担執筆 (査読無し、presubmission inquiry 有り)

- 2) Kanaoka MM. (2014) "Protoplasts from plant female gametophytes" Atlas of Plant Cell Structure Noguchi T, Kawano S, Tsukaya H, Matsunaga S, Sakai A, Karahara I, Hayashi Y. 編集、Springer) の一節として分担執筆 (査読無し、presubmission inquiry 有り)
- 3) 金岡雅浩 (2014) 「授業でそのまま使える最新高校生物解説書」講談社サイエンティフィック (岡田清孝、町田泰則 編) (分担執筆：2 項目を担当) (査読無し)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.higashiyama-lab.com/>

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：