

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440145

研究課題名(和文) アブラナ科植物の和合花粉受容システムの解析

研究課題名(英文) Recognition system in pollen-pistil interaction in Brassicaceae

研究代表者

岩野 恵 (Iwano, Megumi)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：50160130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の生殖は、花粉の柱頭への付着(受粉過程)ではじまり、花粉管の胚珠への誘引を経て受精が成立する。これら一連の過程では、雌蕊と花粉との細胞間コミュニケーションにより適切な花粉(和合花粉)が選抜される。研究代表者はこれまでに、この細胞間コミュニケーションに、Ca²⁺や活性酸素が関与することを示し、和合花粉の発芽・伸長を誘導する雌蕊側のCa²⁺輸送体を同定してきた。本研究では、細胞生物学的解析により、和合受粉時の乳頭細胞内で細胞内膜系と細胞膜との密接な相互作用を可視化し、生化学的解析により、受粉時の乳頭細胞膜で機能するCa²⁺輸送体と相互作用する分子種を見出した。

研究成果の概要(英文)：In the Brassicaceae, intraspecific non-self pollen (compatible pollen) can germinate and grow into the stigmatic papilla cells, while self pollen or interspecific pollen are rejected at this stage. However, the mechanisms underlying this selective acceptance of compatible pollen remain unknown. Here, analysis of live-cell imaging and three dimensional tomography using Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) visualized the interaction between cell membrane and intercellular membrane during compatible pollination, and biochemical analysis clarified the molecules interacting with Ca²⁺ transporter in the papilla cell membrane.

研究分野：植物生理学

キーワード：アブラナ科植物 和合受粉 液胞 小胞体 トランスゴルジネットワーク カルシウム輸送体

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はアブラナ科植物の自家不和合性における花粉側の認識物質として花粉表層に存在するシステインに富んだタンパク質 SP11 を同定し (Suzuki *et al.*, 1999; Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000)、SP11 が乳頭細胞膜上の SRK と相互作用し、SRK のリン酸化を誘起することで自家不和合性反応がおこることを明らかにしてきた (Takayama *et al.*, 2001)。また、SRK リン酸化の下流では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が著しく上昇し、それが自己花粉の拒絶に繋がるとも明らかにしている。一方で、他家受粉時の乳頭細胞と花粉間の細胞間コミュニケーションについては、*Arabidopsis thaliana* の不稔の突然変異体の解析で、花粉表層のタンパク質や脂質が花粉の吸水に必要であることが報告され (Preuss *et al.*, 1993; Jacob *et al.*, 2000; Emily *et al.*, 2009; Ishiguro *et al.*, 2010)、乳頭細胞側の情報伝達系については、エキソサイトシスに関わる分子が関与するという報告があるが (Hsu *et al.*, 2004; Samuel *et al.*, 2009)、和合認識反応の詳細は不明であり、和合受粉時に誘起される情報伝達系についての研究は進んでいない。

研究代表者はこれまでに、この細胞間コミュニケーションに、 Ca^{2+} や活性酸素が関与することを示し、和合花粉の発芽・伸長を誘導する雌蕊側の Ca^{2+} 輸送体を同定した。さらに GFP レポーターアッセイと免疫電顕法により本分子種は細胞膜とゴルジベシクルに局在し、受粉時には花粉発芽部位に集積する結果から、和合受粉時の Ca^{2+} 輸送にかかわっていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物の *A. thaliana* を用いて、分子生物学的・細胞生物学的解析と生化学的解析を包括的に行なうことにより、和合受粉から受精に至る過程での花粉・雌蕊細胞内における Ca^{2+} を介した情報伝達系の実体を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

和合・不和合受粉過程における Ca^{2+} を介した情報伝達系の詳細を分子レベルと細胞レベルで明らかにするために、以下の研究を進めた。

1) ライブセルイメージングによる和合・不和合受粉時の乳頭細胞内形態変化の時系列的解析

2) 走査透過型電子顕微鏡 (STEM) トモグラフィによる乳頭細胞微細構造の 3 次元的解析

3) プロテオーム解析による Ca^{2+} 輸送体の輸送活性の制御因子の探索

4. 研究成果

1) ライブセルイメージングによる和合・不

和合受粉時の乳頭細胞内形態変化の時系列的解析

和合・不和合受粉時の液胞、小胞体、トランスゴルジネットワークの動態を調べた。

液胞については、液胞膜局在型 SNARE に GFP を融合させたコンストラクト (京都府立大佐藤雅彦准教授から供与していただいた) を *B. rapa* の乳頭細胞で高発現の SRK 遺伝子のプロモーターの下流に繋ぐことで

BrSRKpro::VAM3-GFP を作製し、自家不和合性シロイヌナズナに導入して乳頭細胞の液胞膜を可視化した。動態解析の結果、野生型 C24 系統の花粉を受粉させた時 (和合受粉時) には常に細胞膜近傍に位置し、液胞が乳頭細胞の上部を占有していた。一方、 S_3 -SP11 導入植物体の花粉を受粉させた時 (不和合受粉時) には、受粉約 5 分から 10 分後にかけて、花粉直下の領域では液胞膜が集積し、大型の中心液胞は乳頭細胞下部に位置していた。

ER については、GFP の C 末端に ER 貯留シグナル HDEL 繋いだコンストラクトを上記と同様に乳頭細胞で発現させて観察した。その結果、和合受粉時には、ER は乳頭細胞先端部で細胞膜近傍と内部で常に形を変えながら動いている様子が観察された。一方、不和合受粉時には、受粉約 5 分から 10 分後にかけて、花粉直下の領域に GFP 蛍光が集積していた。

トランスゴルジネットワーク (TGN) については、TGN 局在型 SNARE に GFP を融合させたコンストラクトを上記と同様に乳頭細胞で発現させて観察したところ、乳頭細胞先端部では受粉前に比較して花粉直下の細胞膜周辺に位置していたが、不和合受粉時には、受粉 6 分後くらいに GFP 蛍光が乳頭細胞先端に集積していた。

上記のように、受粉約 5 分から 10 分後にかけて、和合受粉時と不和合受粉時で差異が見られ、不和合受粉時に乳頭細胞先端部でのオルガネラの集積が示唆されたが、その形状の詳細は把握できず、細胞膜との位置関係も明確ではなかった。

2) 走査透過型電子顕微鏡 (STEM) トモグラフィによる乳頭細胞微細構造の 3 次元的解析

和合・不和合受粉時の乳頭細胞における細胞内膜構造の形態変化を詳細に解析するために、受粉後 5 分の柱頭を用いて急速凍結・凍結置換法により電顕試料の作製を行なった。厚さ 0.7-2 μm の切片を作製し、10,000-40,000 倍の倍率でそれぞれ傾斜角度 $\pm 70^\circ$ の範囲で STEM 投影像を取得し、画像解析により再構成像を構築した。

その結果、未受粉の乳頭細胞上部では液胞がほとんどの容積を占め、その周囲にゴルジ体、ER、ミトコンドリア、葉緑体が散在していたが、和合受粉後の乳頭細胞では、花粉の吸水時期に、中心液胞の液胞膜が細胞膜に接近あるいは接触していること (図 1)、また

花粉管侵入のための細胞壁の分解が進んでいること、さらにその分解がゴルジ体を介したベシクル輸送と関連していることが示唆された。

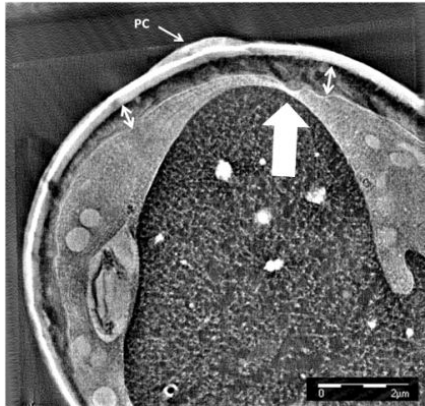


図 1-1 . 和合受粉時の液胞 (再構成像の一部)

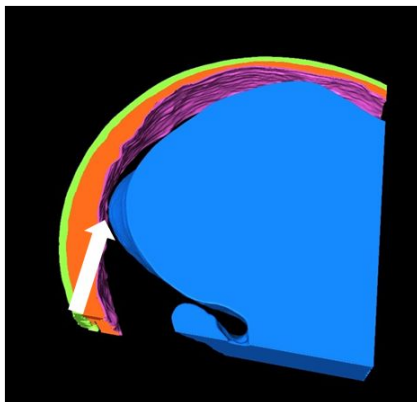


図 1-2 . 再構成像の 3 次元カラー表示 (緑 : クチクラを含む細胞壁の最外層、橙 : 細胞壁の内層、ピンク : 細胞膜、青 : 液胞) 厚さ : 2 μm、倍率 10,000、デジタルスライス厚み 10.8 nm、Z 軸方向 : 109 枚

一方、不和合受粉後には、細胞壁の膨潤・分解、細胞膜の陥入は見られず、中心液胞は細胞膜から離れ、中心液胞膜と連続した小型液胞が細胞膜との間に存在すること (図 2) 細胞膜と平行に位置している ER の他に、塊状の ER が存在することが明らかになった。



図 2 . 不和合受粉時の液胞 (再構成像の一部)

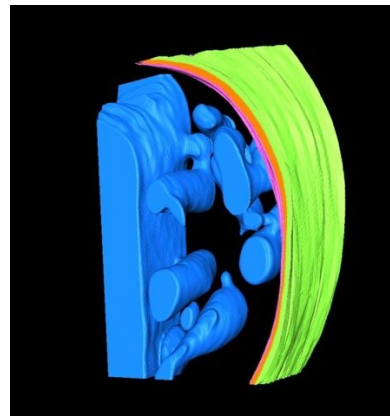


図 2-2 . 再構成像の 3 次元カラー表示 (緑 : クチクラを含む細胞壁の最外層、橙 : 細胞壁の内層、ピンク : 細胞膜、青 : 液胞) 厚さ : 2 μm、倍率 : 10,000、デジタルスライス厚み : 10.8 nm、Z 軸方向 : 115 枚

以上の結果から、和合受粉過程においては液胞膜、あるいは TGN などの細胞内膜と細胞膜との密接に相互作用が見られ、これらのオルガネラを介して乳頭細胞から花粉ヘイオンや水の輸送が起きていることが示唆された。一方、不和合受粉時には乳頭細胞先端部での細胞内膜系の集積が見られ、不和合受粉時特異的な乳頭細胞先端部でのカルシウム濃度上昇との密接な関係が示唆された。

3) プロテオーム解析による Ca^{2+} 輸送体の輸送活性の制御因子の探索

これまでに、受粉後と花粉表層部物質付着後に *A. thaliana* 柱頭で発現誘導される *Autoinhibited Ca^{2+} -ATPase (ACA) 13* を同定し、この遺伝子欠損株では花粉の発芽が遅延することを明らかにしている。そこで、ACA13 と相互作用する因子を探索するために、ACA13-GFP を乳頭細胞で高発現する植物から、受粉前と受粉後 15 分の柱頭をそれぞれ 2,000 個集めて、GFP 抗体で免疫沈降し、ACA13-GFP 膜画分を濃縮し、オービトラップ型の LC/MS/MS 分析装置で解析して、膜画分に含まれるタンパクを探索した。その結果、カルモジュリン様タンパク質やエキソサイトーシスと関与する分子種などとの相互作用が確認できた。

今後、これらの分子種の機能解析を行うことで、和合・不和合受粉時の Ca^{2+} を介した情報伝達系が明らかになると考えている。

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. Matsuda T, Matsushima M, Nabemoto M, Osaka M, Sakazono S, Masuko-Suzuki H, Takahashi H, Nakazono M, Iwano M, Takayama S, Shimizu KK, Okumura K,

Suzuki G, Watanabe M, Suwabe K.
Transcriptional characteristics and differences
in Arabidopsis stigmatic papilla cells pre- and
post-pollination. *Plant Cell Physiol.* 査読有
り 2015 Apr; 56(4):663-73. doi:
10.1093/pcp/pcu209.

2. Iwano M, Ito K, Fujii S, Kakita M,
Asano-Shimosato H, Igarashi M,
Kaothien-Nakayama P, Entani T, Kanatani A,
Takehisa M, Tanaka M, Komatsu K, Shiba H,
Nagai T, Miyawaki A, Isogai A, Takayama S.
Calcium signalling mediates
self-incompatibility response in the
Brassicaceae. *Nat Plants.* 査読有り 2015 Sep
1; 1:15128. doi: 10.1038/nplants.2015.128.
3. Kaya H, Iwano M, Takeda S, Kanaoka MM,
Kimura S, Abe M, Kuchitsu K. Apoplastic
ROS production upon pollination by RbohH
and RbohJ in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.*
査読有り 2015; 10(2):e989050.
doi: 10.4161/15592324.2014.989050.
4. Ichikawa M, Iwano M, Sato MH. Nuclear
membrane localization during pollen
development and apex-focused polarity
establishment of SYP124/125 during pollen
germination in Arabidopsis thaliana. *Plant
Reprod.* 査読有り 2015 Dec; 28(3-4):143-51.
doi: 10.1007/s00497-015-0265-3.
5. Kubo KI, Tsukahara M, Fujii S, Murase K,
Wada Y, Entani T, Iwano M, Takayama S.
Cullin1-P is an Essential Component of
Non-Self Recognition System in
Self-Incompatibility in Petunia. *Plant Cell
Physiol.* 査読有り 2016 Nov;
57(11):2403-2416.
6. Hossain MN, Suzuki K, Iwano M, Matsuda T,
Nagai T. Bioluminescent Low-Affinity
Ca(2+) Indicator for ER with Multicolor
Calcium Imaging in Single Living Cells. *ACS
Chem Biol.* 査読有り 2018 Mar 9.
doi: 10.1021/acscchembio.7b01014.

〔学会発表〕(計4件)

1. Iwano M, Suetsugu N, Nishihama R, Kaku T,
Kochi T, Nagai, T. 19th SANKEN
International symposium, 2015年12月7日
~9日, 大阪大学, 吹田キャンパス.
2. 岩野 恵, 西浜竜一, 鈴木和志, 末次憲之,
石田咲子, 加来友美, 河内孝之, 永井健治.
第57回植物生理学会大会, 2016年3月18
日~20日, 岩手大学, 上田キャンパス.
3. Iwano M, Nishihama R, Suzuki K, Ishida S,
Kaku T, Kochi T, Nagai, T. Development of

brilliant light-emitting Marchantia
polymorpha for single-cell and whole-plant
imaging. 2016年5月29日~6月2日,
ISBC2016 (19th International Symposium on
Bioluminescence & Chemiluminescence),
Tsukuba International Congress Center.

4. 岩野 恵, ライブイメージングのための
発光植物の開発, 2017年6月13日~15日,
日本細胞生物学会大会, 仙台国際センター.

〔図書〕(計1件)

1. Sawada H, Morita M, Iwano M. Self/non-self
recognition mechanisms in sexual
reproduction: new insight into the
self-incompatibility system shared by
flowering plants and hermaphroditic animals.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Aug 1;
450(3):1142-8.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.099.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: デバイス、およびそれを用いた判定シ
ステム

発明者: 永井健治、新井由之、岩野 恵

権利者: 永井健治、新井由之、岩野 恵

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/002591

出願年月日: 2017年2月3日

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 恵 (Megumi Iwano)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教

研究者番号: 50160130

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし ()