

令和元年6月16日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26440168

研究課題名(和文)植物の花粉形成で重要な働きをする新規アラビノキナーゼの機能解析

研究課題名(英文)An L-arabinokinase is required for pollen development in higher plants

研究代表者

上田 健治 (Ueda, Kenji)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80279504

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)：イネの花粉形成に重要なタンパク質CAP1はL-アラビノキナーゼ様タンパク質であるが、その実態は不明であった。本研究では、組換えタンパク質の実験系でCAP1の酵素活性を調べた。その結果、CAP1はL-アラビノースのみをリン酸化するキナーゼ活性を有することが実証された。また、CAP1の中央からC末端領域が活性に重要であり、この領域内の糖結合とATP結合の2つのドメインは活性に必須であった。さらに、CAP1は二細胞花粉期の細胞壁に局在して細胞壁多糖の供給に重要な働きをすること、イネ以外の植物においても花粉形成に特異的に働くL-アラビノキナーゼ遺伝子が存在することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、イネの花粉形成に必須なタンパク質CAP1がL-アラビノキナーゼであることが実証されたとともに、その活性には重要な領域を同定することができた。また、CAP1が二細胞花粉期の雄原細胞や栄養細胞の細胞壁に局在し、二細胞花粉期の進行に重要であることもわかった。さらに、広範囲の植物の花粉形成でCAP1類似タンパク質が重要な働きをしていることが明らかになった。これらの研究成果は、花粉形成を理解して植物の生殖機構を明らかにするための新しい知見であるとともに、人為的に花粉を不活化する花粉不稔剤の開発にも利用できる。花粉不稔剤は植物の品種改良や花粉症軽減などに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：An L-arabinokinase-like CAP1 protein is required for pollen development in rice. In this study, we obtained recombinant CAP1 and several mutant CAP1 proteins using *E. coli* expression vector in bacterial cells, and analyzed these L-arabinokinase activity. The enzymatic activity was measured by the luciferase assay after an arabinokinase reaction. As a result, CAP1 is an actual L-arabinokinase, and the C terminal half of CAP1 was found to be important for the L-arabinokinase activity. Next, we observed ultrastructure of cap1 mutation by electron microscopy, and examined CAP1 distribution using specific antiserum. CAP1 was detected on generative cell wall and intine in bicellular pollen by immune-electron microscopy using a specific antiserum. CAP1 is required for progression of bicellular pollen stage during pollen development. In addition, we examined two Arabidopsis homologs using T-DNA insertion lines, and found the AtARA2 is important for pollen development.

研究分野：植物生殖生理

キーワード：花粉形成 L-アラビノキナーゼ イネ シロイヌナズナ 糖代謝 突然変異体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民病ともいわれる花粉症の原因因子である花粉は、植物にとって雄性の遺伝子情報を次世代へ伝える重要な細胞であるとともに、種子形成に必須の細胞である。花粉形成を含む植物の生殖機構が解明されれば、食料危機問題の克服につながる事が期待できる。

近年の網羅的な遺伝子発現解析などにより、花粉形成に非常に多くの遺伝子が関わる事が示唆されているが、機能が解明された遺伝子は限られている。申請者らは、イネの花粉形成異常を示す突然変異体を単離・解析してきた。その結果、花粉形成過程で特異的な働きをする遺伝子の同定に成功し、これを変異体の表現型から *Collapsed Abnormal Pollen1* (*CAP1*) と命名した (Ueda et al, 2013)。CAP1 遺伝子が機能喪失したイネでは細胞核・細胞壁・細胞質成分が消失して花粉外壁 (エキシン) のみになった花粉しか作られないが、花粉以外の植物の生長 (草姿、草丈、分けつ数、開花時期、穂の形態など) には全く影響がなかった。CAP1 遺伝子は L-アラビノキナーゼ様のタンパク質をコードしていたが、この酵素に関わる論文報告は殆どなかった。唯一、シロイヌナズナにおいて L-アラビノキナーゼの感受性変異体 *atar1* の原因遺伝子 *AtARA1* の報告があるが、遺伝子発現や酵素活性などに関わる報告は無かった。また、イネとシロイヌナズナゲノムを検索すると、関連遺伝子としてイネの *OsARA1* とシロイヌナズナの *AtARA2* が見出されたが、いずれも論文報告はない。このように、CAP1 をはじめとする植物の L-アラビノキナーゼは未知の酵素といっても過言ではない。

CAP1 と相同性の高い酵素遺伝子はバクテリアや動物のゲノム内には見つからないため、CAP1 は植物特有の酵素遺伝子である。植物の細胞壁代謝では、L-アラビノース以外の単糖も再利用すると考えられているが、イネとナズナのゲノム内にはこれらの単糖をリン酸化する酵素類 (ガラクトキナーゼ、グルクロノキナーゼ、ガラクトツロノキナーゼなど) はゲノム中に 1 遺伝子ずつしか無い。なぜ L-アラビノキナーゼだけが 2 コピーあるのか、酵素活性に重要な領域はどこなのかなど、L-アラビノキナーゼは被子植物に普遍的に存在するものもその実態は殆どわかっておらず、研究成果は学術的に高い意味を持つ。

2. 研究の目的

被子植物の花粉形成では、減数分裂後に 2 回の体細胞分裂がおこり配偶子ができる。この過程で活発な細胞壁の代謝が予想されるが、これに関わる分子レベルでの知見は殆どない。申請者らはイネの花粉形成で重要な働きをする新規の L-アラビノースリン酸化酵素 (L-アラビノキナーゼ) を見出し、CAP1 と命名した。本研究では、花粉型 L-アラビノキナーゼ CAP1 と体細胞型 L-アラビノキナーゼ *OsARA1* との組織・細胞内での局在を比較解析するとともに、CAP1 の組換えタンパク質および部分欠失タンパク質を合成して酵素活性に重要な領域を同定することを主目的とする。また、イネ以外の植物でも CAP1 類似タンパク質遺伝子を見出したため、これらの発現解析および機能解析をおこなうことによって、被子植物の花粉形成に関わる L-アラビノキナーゼの実態に迫る。

3. 研究の方法

(1) 微生物を利用した組換え CAP1 タンパク質の合成

イネの花粉から CAP1 タンパク質を抽出・精製することは非常に困難であるため、遺伝子組換え技術を利用して、イネの CAP1 タンパク質を合成してその酵素活性を調べた。まず、イネの CAP1 遺伝子 (cDNA) をタンパク質発現用ベクターに挿入し、組換えタンパク質合成用の大腸菌株に構築したプラスミドを導入し、タンパク質を合成させた後に精製した。この方法によって、全長の CAP1 タンパク質の他に、タンパク質の N 末端から中央領域まで、中央領域から C 末端までなど各種の変異タンパク質も同様の方法で作製した。

(2) 組換え CAP1 タンパク質の L-アラビノキナーゼ活性

L-アラビノキナーゼは新規の酵素であり、その酵素活性に関する論文報告は殆ど無い。そこで、L-アラビノキナーゼとは別の糖キナーゼであるガラクトキナーゼの反応溶液を参考にした (Egert et al, 2012)。最終的なキナーゼ活性の有無は、ホタルのルシフェラーゼを用いた発光によって検出した。すなわち、第一段階で、組換え CAP1 タンパク質、ATP、L-アラビノキナーゼを含む溶液でキナーゼ反応させ、第二段階でキナーゼ反応液にルシフェラーゼとその基質であるルシフェリンを加えて発光反応させた。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光には、ATP が必要なため、キナーゼ反応の際に ATP を消費すると発光が弱まり、キナーゼ活性が全くない場合は強く発光する。酵素として、全長タンパク質あるいは変異タンパク質を加えた反応、また、基質に L-アラビノースの他に細胞壁成分である各単糖を加えた実験も行った。

(3) *cap1* 変異花粉の電子顕微鏡観察と抗 CAP1 血清による免疫電顕

小孢子期および二細胞花粉期の細胞を含む穂を採取し、グルタルアルデヒドおよびパラホルムアルデヒドを含む溶液で固定した。また、免疫電顕用試料は、パラホルムアルデヒドで穂を固定した。穂から葯を取り出し、樹脂に包埋したのちに超薄切片を作成した。免疫染色には、

CAP1 と OsARA1 のアミノ酸配列を元に合成したペプチドを抗原としてウサギに免疫したが、抗 OsARA1 血清の反応がよくなかったため、抗 CAP1 血清だけを用いて実験を行った。一次抗体として抗 CAP1 抗血清を、二次抗体として金コロイド粒子で標識した抗ウサギ IgG 抗体を用いて染色して、電子顕微鏡で観察した。

(4) データベース解析

イネ CAP1 タンパク質のアミノ酸配列について、生物全般の遺伝子データベース PubMed およびシロイヌナズナデータベース ForestGEN (Futamura et al, 2009) を検索し、CAP1 タンパク質と相同なタンパク質遺伝子データを収集した。

(5) シロイヌナズナの L-アラビノキナーゼ遺伝子変異体の解析

相同性検索の結果、シロイヌナズナでは、2 種類の L-アラビノキナーゼ様タンパク質遺伝子が発見された。そこでこれら 2 つの遺伝子に T-DNA が挿入された遺伝子破壊系統種子を米国シロイヌナズナ種子バンク TAIR から入手した。栽培して開花直前の蕾をエタノールと酢酸を 1 : 3 の比率で混合した溶液で固定し、光学顕微鏡で観察した。また、葉から DNA を抽出し、T-DNA が挿入された領域を増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅したのちに塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 微生物を利用した組換え CAP1 タンパク質の合成

タンパク質構造解析ソフト Pfam で解析すると、CAP1 タンパク質の N 末端から中央領域には糖転移酵素ドメイン GT1、中央から C 末端領域には糖結合ドメインと ATP 結合ドメインが予測された。そこで、CAP1 タンパク質の N 末端から中央領域に相当する変異タンパク質を rCAP1N、中央領域から C 末端までに相当する変異タンパク質 rCAP1C とした。さらに、CAP1C に予想された糖結合ドメインを除いた変異タンパク質 rCAP1C 1、同様に CAP1C の ATP 結合ドメインを除いた変異タンパク質 rCAP1C 2 として、これらを合成したのちに精製した。精製の過程を SDS ゲル電気泳動でモニターしたところ、rCAP1N 以外の 4 つの精製分画からは、各タンパク質のアミノ酸配列から期待されるサイズに相当するシングルバンドが検出された。rCAP1N は期待されるサイズに加えて幾つかのバンドが混入していた。

(2) 組換えタンパク質を利用した CAP1 のアラビノキナーゼ活性

まず、L-アラビノースと ATP を含む反応溶液に、1 µg、3 µg、5 µg の rCAP1 を加えてそれぞれの活性を検定したところ、加えた rCAP1 の量に比例して相対発光量が減少した。従って、rCAP1 は L-アラビノースを基質として ATP を消費する L-アラビノキナーゼ活性を持つことが実証された。次に、細胞壁多糖を構成する単糖であるガラクトース、ガラクトツロン酸、グルコース、フコースなどを L-アラビノースの代わりに加えて活性を検定したところ、調べた全ての単糖を用いた反応では発光量が、単糖を加えないコントロールと同程度であった。従って、CAP1 は L-アラビノースのみを基質にすることが示唆される。

(3) 変異タンパク質を用いた CAP1 の重要な領域の同定

全長タンパク質に相当する rCAP1 をポジティブコントロール、タンパク質を加えない反応をネガティブコントロールとして、rCAP1N と rCAP1C の活性を検定したところ、rCAP1N は水と同様に発光量の減少は検出されなかったが、rCAP1C は rCAP1 と同程度の活性が検出された。このことから CAP1 の L-アラビノキナーゼ活性には中央から C 末端までの領域で十分であることがわかった。さらに、活性を示した CAP1C から 2 つのドメインをそれぞれ除いた rCAP1C 1 および rCAP1C 2 はいずれも活性が消失した。これらの結果から、CAP1 の L-アラビノキナーゼ活性には、タンパク質の中央から C 末端までの領域で十分であること、この領域に含まれる糖結合ドメインと ATP 結合ドメインと予測された配列は活性に必須であることが明らかになった。

(4) *cap1* 変異花粉の電子顕微鏡による観察

cap1 の小胞子を観察したところ、対象とした野生型の日本晴の小胞子と区別がつかなかった。二細胞期の正常な雄原細胞の細胞壁は均一な厚さであった。これに対し、変異花粉の二細胞期の観察では、細胞壁の部分的な欠如や不均一な厚みの細胞壁が雄原細胞で観察された。また、別の花粉では電子密度が非常に濃い雄原細胞が観察され、細胞死が起きていると考えられた。また、栄養細胞では、細胞質の顕著な異常は観察されなかったが、細胞壁の厚さが極めて薄くなっていた。これらの結果と L-アラビノキナーゼは L-アラビノースの再利用経路で働くことを考え合わせると、CAP1 の変異による花粉内の細胞壁多糖の不足が栄養細胞と雄原細胞の細胞壁の異常を誘引するとともに、異常蓄積した L-アラビノースが特に雄原細胞の細胞死を引き起こすことが示唆された。

(5) 免疫電顕による CAP1 タンパク質の局在

野生型イネである日本晴の小孢子および二細胞期の花粉における CAP1 タンパク質の局在を免疫電顕により調べた。まず、小孢子では細胞全体で CAP1 タンパク質の局在を示す金コロイド粒子は殆ど観察されなかった。一方、二細胞期の花粉では、非常に多くの金コロイド粒子が雄原細胞と栄養細胞の細胞壁から観察された。従って、CAP1 は花粉内の両方の細胞壁内に局在し、細胞壁の形成に関わることを示唆された。

(6) シロイヌナズナの L-アラビノキナーゼ遺伝子変異体の解析

シロイヌナズナゲノム中には *AtARA1* と *AtARA2* の 2 つの L-アラビノキナーゼ様遺伝子がある。このうち、*AtARA1* は L-アラビノース感受性変異体の解析から見出された遺伝子である (Dolezal and Cobbett, 1991; Sherson et al, 1999)。もう 1 つの *AtARA2* の報告はない。TAIR の HP でこれらの遺伝子の T-DNA 挿入変異体を検索すると、*AtARA1* はホモ接合体の種子があり、*AtARA2* はヘテロ接合体の種子のみしかなかったため、これらの種子を入手して花粉の観察をおこなった。*AtARA1* ホモ接合体の花粉は、野生型 Col-0 の花粉と比較して全く正常に観察された。また、*AtARA2* の葯内の花粉は、約 50% が中空で、残り 50% が正常であった。従って、*AtARA1* タンパク質は花粉形成には必要ないが、*AtARA2* タンパク質は必須であることが明らかになった。

(7) 被子植物の L-アラビノキナーゼ様遺伝子の解析

データベースの解析により、イネとシロイヌナズナの他にブラキポディウム、トウモロコシ、ソルガム、ブドウ、ダイズ、ポプラなどのゲノム内には 2 つずつの L-アラビノキナーゼ様のタンパク質遺伝子が見出された。イネとシロイヌナズナのように 2 つのうち 1 つが花粉形成に関わると予想された。さらに、裸子植物のスギの雄花でも類似遺伝子が発現していることが明らかになった (Futamura et al, 2008)。従って、多くの植物の花粉形成で L-アラビノキナーゼが重要な働きをすることが示唆された。

参考文献

- Dolezal O, Cobbett CS, Arabinose kinase-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 96: 1255-1260, 1991
- Egert A, Peters S, Guyot C, Stieger B, Keller F, An Arabidopsis T-DNA insertion mutant for galactokinase (*AtGALK*, *At3g06580*) hyperaccumulates free galactose and is insensitive to exogenous galactose. *Plant Cell Physiol* 53: 921-929, 2012
- Futamura N, Totoki Y, Toyoda A, Igasaki T, Nanjo T, Seki M, Sakaki Y, Mari A, Shinozaki K, Shinohara K, Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* 9: 383, 2008
- Sherson S, Gy I, Medd J, Schmidt R, Dean C, Kreis M, Lecharny A, Cobbett C, The arabinose kinase, *ARA1*, gene of *Arabidopsis* is a novel member of the galactose kinase gene family. *Plant Mol Biol* 39: 1003-1012, 1999
- Ueda K, Yoshimura F, Miyao A, Hirochika H, Nonomura KI, Wabiko H, *COLLAPSED ABNORMAL POLLEN1* gene encoding the arabinokinase-like protein is involved in pollen development in rice. *Plant Physiol* 162: 858-871, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- Takahashi T, Mori T, Ueda K, Yamada L, Nagahara S, Higashiyama T, Sawada H, Igawa T, The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants, *Development*, 査読あり, 145: dev170076, 2018
- 上田健治, イネの花粉形成の分子基盤, 横浜市立大学論叢自然科学系列, 査読なし, 65: 73-92, 2017
- 上田健治, 植物の花粉形成に重要な働きをするアラビノキナーゼ CAP1, アレルギーの臨床, 査読なし, 37: 82-87, 2017
- 上田健治, 植物の花粉形成に重要な働きをするアラビノキナーゼ CAP1, アグリバイオ, 査読なし, 1: 66-71, 2017
- Oh K, Hoshi T, Tomio S, Ueda K, Hara K, Chemical genetics strategy identifies small molecules induce triple response in *Arabidopsis*. *Molecules*, 査読あり, 22: 2270, 2017
- Satoh T, Tezuka K, Kawamoto T, Matsumoto S, Satoh-Nagasawa M, Ueda K, Sakurai K, Watanabe A, Takahashi H, Akagi H, Identification of QTLs controlling low-temperature germination of the East European rice (*Oryza sativa* L.) variety Maratteli, *Euphytica*, 査読あり, 207: 245-254, 2016

〔学会発表〕 (計 7 件)

Ueda K, Yamanami S, Hiratsuka R, Suzuki T, Sakurai K, Watanabe A, Takahashi H, Wabiko H, Akagi H, An L-arabinokinase is required for pollen development in higher plants, 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction, Gifu Japan, 2018
鈴木智博, 上田健治, 山波佐祐里, 櫻井健二, 渡辺明夫, 高橋秀和, 我彦広悦, 赤木宏守, イネの花粉形成に重要な CAP1 の L-アラビノキナーゼ活性, 第 12 回東北育種研究集会, 2017
Ueda K, Yamanami S, Hiratsuka R, Suzuki T, Sakurai K, Watanabe A, Takahashi T, Akagi H, Wabiko H, An L-arabinokinase activity of CAP1 required for pollen development in rice, Taiwan-Japan Plant Biology, 2017
Ueda K, Yamanami S, Hiratsuka R, Sato-Nagasawa N, Tanaka I, Akagi H, Wabiko H, An L-arabinokinase CAP1 is required for pollen development in rice. 14th International Symposium on Rice Functional Genomics, Montpellier France, 2016
上田健治, 山波佐祐里, 平塚理恵, 佐藤(永澤)奈美子, 田中一朗, 赤木宏守, 我彦広悦, イネの花粉形成に必須な L-アラビノキナーゼ CAP1 の解析, 日本植物学会第 80 回大会, 2016
平塚理恵, 上田健治, イネ *cap1* 変異体における花粉形成過程の微細形態解析, 日本植物形態学会第 27 回大会, 2015
上田健治, 吉村郁晶, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦, 野々村賢一, 我彦広悦, イネの花粉形成に重要なアラビノキナーゼ遺伝子 *CAP1* の解析, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014

〔図書〕(計 1 件)

Nonomura K, Ono S, Ueda K, Molecular regulation of meiotic fate decision and gametophyte specification in rice. *In* Rice Genomics, Genetics and Breeding (Sasaki T and Ashikari M eds.) pp.69-95, Springer-Nature, 2018

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.dbp.akita-pu.ac.jp/~iden/index.html>
<https://researchmap.jp/read0051108/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平塚 理恵

ローマ字氏名：(HIRATSUKA, Rie)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。