

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660004

研究課題名(和文) イネ花粉管誘引物質の同定と交雑不和合機構解明への挑戦

研究課題名(英文) Search for pollen tube attractants in rice

研究代表者

高梨 秀樹 (Takanashi, Hideki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60707149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおいては花粉管誘引関連の研究は大きく立ち遅れておりいまだ花粉管誘引物質の同定もなされていない。この状況を打破すべく、本研究では申請者がこれまでに行ってきたイネ助細胞における詳細な遺伝子発現プロファイルをもとにイネ花粉管誘引物質の探索を行った。イネ助細胞において高発現する遺伝子を精査したところ、そこには興味深いことにこれまでにトレンニアやシロイヌナズナにおいて同定された花粉管誘引物質をコードするLURE遺伝子群は含まれていないことが明らかになった。一方で機能未知の分泌タンパク質をコードする遺伝子は多数含まれており、これらは有望なイネ花粉管誘引物質候補であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Researches about pollen tube guidance have not well investigated in rice, and pollen tube attractants are not identified in rice until now. To search pollen tube attractants in rice, I searched rice pollen tube attractants based on detailed gene expression profiles of the rice synergid cell. As a result of careful examination of gene expression profiles, interestingly, LURE genes which had been identified as pollen tube attractants in *Torenia* and *Arabidopsis* did not exist in the highly expressed genes of rice synergid cell. On the other hand, a lot of genes encoding unknown secreted proteins were highly expressed in the rice synergid cell, so they seemed to be promising candidates for the pollen tube attractants in rice.

研究分野：遺伝育種科学

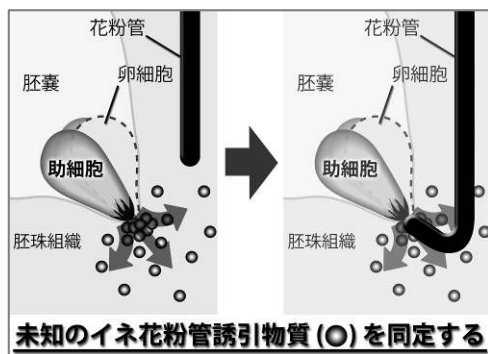
キーワード：イネ 花粉管誘引 助細胞

1. 研究開始当初の背景

運動性能を持たない植物の精細胞が卵細胞と受精するためには、花粉管によって自身を卵細胞付近まで運搬してもらう必要がある。では花粉管はどのようにして迷わず卵細胞付近までたどり着くのだろうか？近年、トレニアおよびシロイヌナズナにおいて花粉管誘引物質として助細胞特異的に高発現するシステイン残基に富む低分子量分泌性タンパク質 (LUREs) の同定が報告された (Okuda, Tsutsui et al. Nature 2009, Takeuchi and Higashiyama PLoS Biol. 2012)。また、花粉管誘引物質は進化速度が速く種特異性が高いことから (Higashiyama et al. Plant Physiol. 2006, Kanaoka et al. Ann. Bot. 2011)、花粉管誘引物質は交雑不和合性の重要な鍵因子の一つになっていると考えられる。このことから、育種観点からも花粉管誘引物質は非常に重要な因子であると言えるものの、重要な穀物であるイネ花粉管誘引物質の研究は進展しておらず、その実体についてはいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述のように近年の研究により、いくつかの植物種において花粉管を誘引する最終的な物質が、卵細胞に隣接する助細胞から分泌される低分子量分泌性タンパク質であることが明らかになった (下図)。しかしながらイネにおいてはその研究は進展しておらず、イネ花粉管誘引物質はいまだ不明である。花粉管誘引の分子機構を解明し、それを応用することで交雑不和合性を打破し、野生種の有用形質を栽培種に導入できる可能性があるという点で、育種観点からもイネ花粉管誘引物質の同定には大きな意味がある。そこで本研究では、申請者がこれまでに得てきたイネ助細胞の遺伝子発現プロファイルの成果を用いて、いまだ明らかになっていないイネ花粉管誘引物質の同定、および交雑不和合機構の解明を目的とした。



3. 研究の方法

イネ (日本晴) 花粉管誘引物質の同定に向けて、本研究ではまずこれまでに申請者が得てきたイネ雌性配偶体構成細胞 (Fig. 1: 卵細胞, 助細胞, 中央細胞, 反足細胞. Female Gametophytic cells; 以下 FG 細胞と略記) の

RNA-seq のデータをもとに イネ助細胞で高発現する分泌性の花粉管誘引物質候補を選抜する。選抜された候補に対して 候補遺伝子の発現抑制株を作製・観察し、さらに 組み換えタンパク質を合成し、それに花粉管誘引活性があるかを培地上で評価する。に関して受粉後の花粉管が雌蕊内部で迷走し、かつ に関して培地上に設置した組み換えタンパク質にイネ花粉管が誘引されるものという、 および で共にポジティブな結果が出たものに関して、これを日本晴花粉管誘引物質とする。さらに、同定した日本晴花粉管誘引物質をもとに野生種花粉管誘引物質を同定し、両者の花粉管誘引能の差異を培地上で検証し、交雑不和合機構の一端を解明することを目指す。

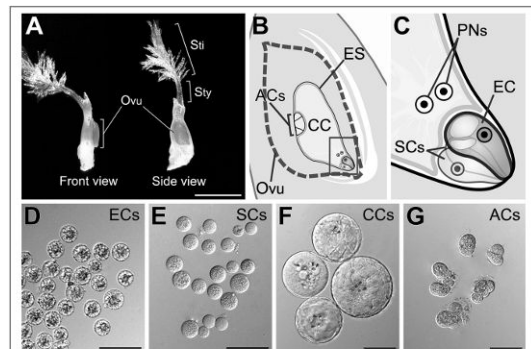


Fig. 1 イネ FG 細胞の単離・回収 (A) 半分に割いた開花直前のイネ雌蕊. (B) イネ雌蕊内部、胚珠の模式図. (C) B 枠内拡大図. 単離・回収した卵細胞 (D)、助細胞 (E)、中央細胞 (F)、および反足細胞 (G). F 内の矢印は極核を示す. これらの細胞が順次正常に機能することで、人類の生存を支える機構とも言える重複受精が成立する. AC 反足細胞, CC 中央細胞, EC 卵細胞, ES 胚嚢, Ovu 胚珠, PN 極核, SC 助細胞, Sti 柱頭, Sty 花柱. Bars = 0.5 mm in (A), 100 μ m in (D-G).

4. 研究成果

<イネ花粉管誘引物質候補の選抜>

これまで知られている花粉管物質の特徴 (助細胞特異的に高発現するシステイン残基に富む低分子量分泌性タンパク質) を参考にしつつ、イネに特有の花粉管誘引物質が存在することも考慮しながら候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、イネ助細胞において特異的に発現している多数の分泌性タンパク質をコードする遺伝子を見出した (下表)。これらはその特異的発現性からイネ花粉管誘引物質としての条件に合致する信頼性の高い候補であると考えられた。

MSU_ID	Annotation	EC	SC	CC	AC	SAM
LOC_Os08g24300	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os08g04640	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os04g50750	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os11g08250	DEFL30	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os11g32070	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os04g22330	SCP-like extracellular protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os05g34320	Glycoside hydrolase; family 20 protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os04g22220	SCP-like extracellular protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os03g02050	Nonspecific lipid-transfer protein 2	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os01g52960	Subtilisin N-terminal Region family protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os03g14550	Gibberellin-regulated GASA family protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os01g62000	Pectate lyase 4 precursor	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os10g26150	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os08g28020	retrotransposon protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os01g31270	Annexin domain containing protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os03g51530	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os04g11962	expressed protein	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os08g41780	Triacylglycerol lipase precursor	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os06g06740	MYB family transcription factor (OsMYB98)	High	Low	Low	Low	Low
LOC_Os02g02320	Putative Serine Carboxypeptidase homologue	High	Low	Low	Low	Low

● : Predicted protein localization are "secreted"

Relative expression value Log₂PKM (Scale: 1 to 4)

一方で、イネ助細胞ではシロイヌナズナやトレニア等で同定された花粉管誘引物質遺伝子と相同性の高い遺伝子はほとんど高発現していないことが明らかになり、今後はより慎重な選抜・評価が必要になると考えられた。

<観察系・実験系の確立・改善>

受精の場である雌蕊子房内のイメージングが容易であるシロイヌナズナやトレニアとは異なり、イネ胚珠は組織が厚く自家蛍光も発することから通常の観察法では胚嚢内部の観察が困難であったため、イネ子房内および胚珠内におけるイメージング技術の改良を行った。

まずイネ子房内を通過していく花粉管の可視化に関して、通常のアニンブルー染色では子房組織の自家蛍光が強く、組織深部を走る花粉管の詳細な観察は難しかった (Fig. 2A)。そこで様々な植物種におけるアニンブルー染色手法を検討したところ、乳酸エタノールを用いた事前処理を行うことによって格段に視認性の良い染色像が撮影可能であり、珠孔に突入する段階まで花粉管を詳細に観察することが出来ること became 明らかになった (Fig. 2B)。

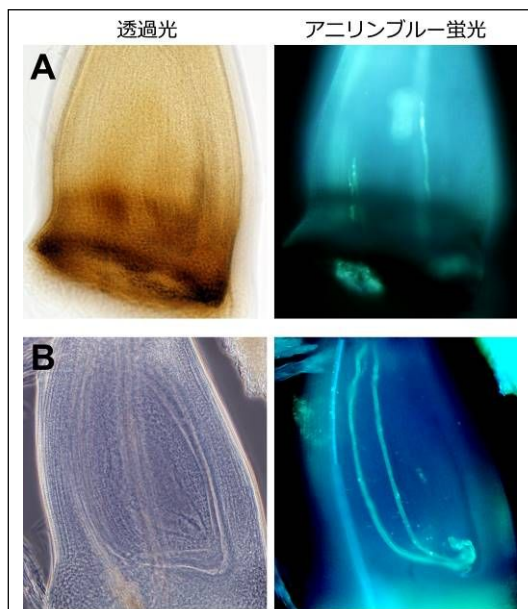


Fig. 2 イネ子房内花粉管の染色手法の改良
(A) 従来法 (NaOH 処理) による染色像。自家蛍光が強く内部の胚珠付近が観察できていない。(B) 改良法 (乳酸エタノール処理) による染色像。組織がより透明化し、珠孔に突入した花粉管先端部まで観察可能。

続いて胚珠内部の FG 細胞の観察法に関しても改良を行った。前述した通り、問題は例えば FG 細胞特異的に GFP を発現させた形質転換イネ胚珠をそのまま観察しても、珠心組織の厚さおよび自家蛍光の強さが原因で明確な GFP 蛍光が観察できないという点にあった。組織が透明化できればこれらは解決できるが、組織透明化に一般的に用いられるホイヤーズ液等はタンパク質を失活させてしまうため GFP の観察には適用できないという

問題があった。これらの問題を解決するため、申請者は近年報告された複数の GFP 蛍光を損なわない組織透明化法の比較を行い、イネ胚珠観察に最適な観察条件を検討した。その結果、イネ胚珠に関しては Scale 透明化液 (Hama et al. 2011) を用いた際に最も鮮明な胚嚢内 GFP 像が観察できることがわかった。

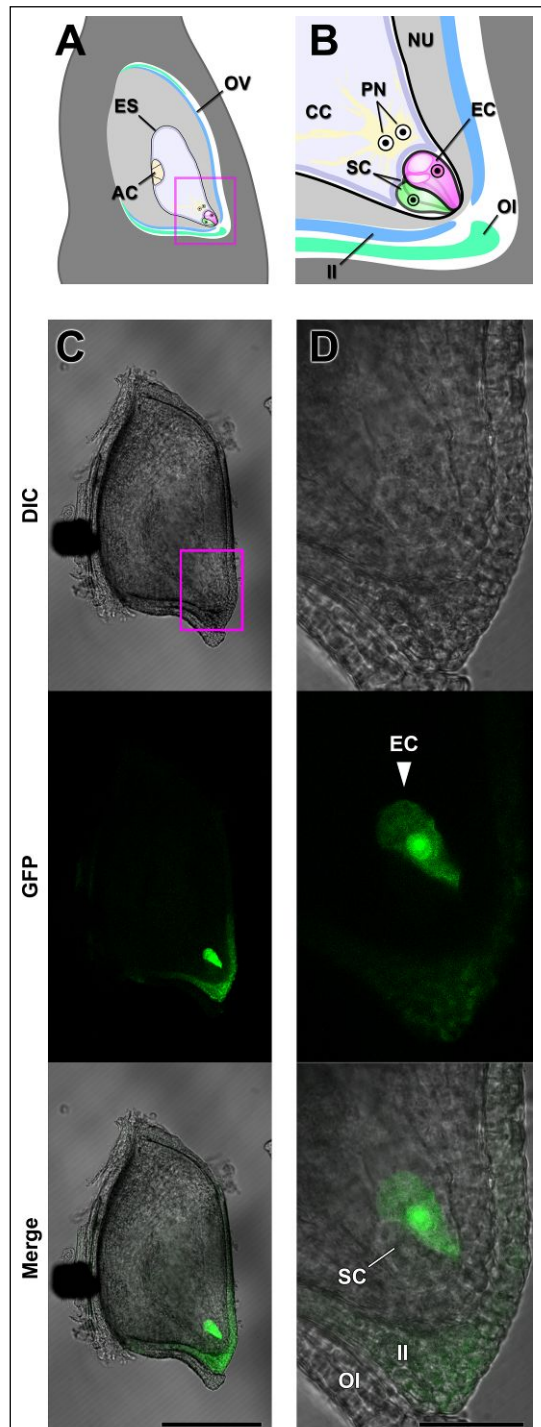


Fig. 3 イネ胚嚢内 GFP 観察手法の改良
(A) イネ雌蕊縦断面の模式図。(B) A 枠内の拡大図。(C) 一例として卵細胞特異的に GFP を発現させた形質転換体の胚珠を Scale 法により観察した蛍光像を示す。(D) C 枠内の拡大図。本手法を用いることで、胚珠内に存在するにもかかわらず、細胞の形状のみならず卵細胞核まで明確に観察できることがわかる。AC, antipodal cells; CC, central cell; EC, egg cell; ES, embryo sac; II, inner integument; NU, nucellus; OI, outer integument; OV, ovule; PN, polar nuclei; SC, synergid cell. Bars = 200 μm in C, 50 μm in D.

花粉管誘引物質の同定には、花粉管が胚珠からの誘引シグナルにどのように応答するかを生きた状態で観察できる semi in vitro 重複受精系を用いた、候補物質の花粉管誘引活性解析が必須であるものの、イネにおいてはこれまで花柱を経由した花粉管を用いて培地上の胚珠と受精を行う semi in vitro 重複受精系の報告はない。わずかに存在した培地上での花粉管伸長に関する報告でもバーストした花粉内容物を花粉管と誤認しており、そこで報告されていた花粉管伸長培地を用いた場合はやはり健全な花粉管の伸長は見られなかった (Fig.4 左)。そこで semi in vitro 重複受精系の確立に必須となるイネ花粉管伸長培地の改善を試みた。多数の条件で検討を行った結果、既報の培地と比較して明らかに花粉管の伸長が良好である培地の組成を見出した (Fig. 4)

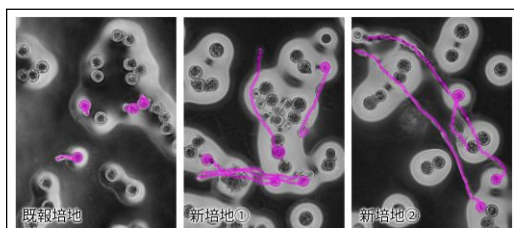


Fig. 4 イネ花粉管伸長培地の改良

培地上で発芽・伸長した花粉管をマゼンタで疑似カラー表示した。健全な花粉管がほとんど伸長しなかった既報培地と比較して新培地ではより長く健全な花粉管が伸長することがわかる。

ただし、この新培地においても花粉管の発芽率および伸長度合いは semi in vitro 重複受精系に用いるには若干の不足があるため、今後の更なる検討が必要であると考えられた。

残念ながら本申請期間中にイネ花粉管誘引物質の同定には至らなかったものの、本申請により様々な技術・知識の蓄積が得られたことから、今後もそれらを生かして目標の達成を目指していく予定である。

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 1 件)

Takanashi H, Sumiyoshi H, Mogi M, Hayashi Y, Ohnishi T and Tsutsumi N (2018) mRNAs control HAM1 functions at the single-cell-layer level and are essential for normal embryogenesis in Arabidopsis. Plant Mol Biol, 査読有, doi: 10.1007/s11103-018-0719-8.

[学会発表](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmg/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高梨 秀樹 (Takanashi Hideki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60707149