

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570040

研究課題名（和文） アブラナ科植物の和合受粉シグナルとその情報伝達系の解析

研究課題名（英文） Analysis of signal transduction mechanism during cross-pollination in Brassicaceae

研究代表者

岩野 恵 (IWANO MEGUMI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50160130

研究成果の概要：アブラナ科植物シロイヌナズナにおける和合受粉過程の分子機構の解明を目指して、「和合受粉シグナル」を特定するための  $\text{Ca}^{2+}$  動態を指標としたバイオアッセイ系を構築し、受粉時に花粉表層物質により誘導される柱頭の遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定した。その結果、和合受粉シグナルはタンパク質性である可能性が示唆され、和合受粉過程では  $\text{Ca}^{2+}$  輸送系や  $\text{Ca}^{2+}$  を介したシグナル伝達系が機能することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：生殖、アブラナ科植物、和合受粉、 $\text{Ca}^{2+}$ 

## 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物の初期受粉では、雌ずいに運ばれる多くの異種の花粉（種間不和合性）や、同種であっても自己の花粉（自家不和合性）は雌ずい乳頭細胞によって認識され、花粉の発芽・伸長が抑制される。それに対して、同種の非自己の花粉では、花粉の吸水の後に花粉管が発芽・伸長して受精へと至る。しかし、なぜアブラナ科植物の柱頭が、同種の花粉と異種の花粉を識別できるのか、またその識別の後に雌ずい乳頭細胞でどのような遺伝子が機能して、花粉が吸水し、花粉管を発

芽させ乳頭細胞に侵入できるのかという、和合受粉過程のメカニズムについては、明らかではない状況であった。

申請者はこれまでに受粉時花粉の認識に関わると考えられる雌ずい先端の乳頭細胞内の生理的変化を、様々な手法を用いて解析してきた。そして、和合受粉時には、乳頭細胞から花粉への水や  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Cl}^{-}$  などのイオンの供給、乳頭細胞や花粉での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化、アクチンフィラメントの再構成、活性酸素の発生などの生理的変化がおきることを明らかにしてきた。さらに、上記の生理変化は花粉表層物質単独でも誘起されることを

明らかにした。このことから、花粉表層には種々の生理変化を誘起する物質（「和合受粉シグナル」と呼ぶ）が存在することが示唆された。

そこで、「和合シグナル」の実体を明らかにすることと、これらの生理的变化に関わる乳頭細胞内の遺伝子を特定することが和合受粉過程の解明に必須であると着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物シロイヌナズナを用いて、「和合受粉シグナル」を特定するためのバイオアッセイ系を構築することと、花粉表層物質により誘導される遺伝子群を柱頭組織のマイクロアレイ解析により同定し、和合受粉過程の分子機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 「和合受粉シグナル」の探索のためのバイオアッセイ系の構築

以下のイメージングによるバイオアッセイ系を構築する。

#### ① $\text{Ca}^{2+}$ センサータンパク質を用いた高感度 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの構築

細胞質でのイメージングのためには、雌ずい乳頭細胞で高発現のSRK遺伝子、または花粉で高発現のAct1遺伝子のプロモータを用い、その下流にyellow cameleon(YC)3.60遺伝子を繋いだコンストラクトを用いた。また、小胞体のイメージングのためには、小胞体移行シグナルをYC4.60に付与したコンストラクトを用いた。シロイヌナズナに遺伝子導入し、得られた高発現体を用いて花粉表層物質塗布後、或いは受粉時の花粉と乳頭細胞のモニタリングを行った。

#### ② 蛍光指示薬による細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

$\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬カルシウムグリーンを乳頭細胞に塗布し乾燥後、花粉あるいは花粉表層物質を付着させて、カルシウムグリーンの蛍光量が上昇するかどうかを調べることで、乳頭細胞からの  $\text{Ca}^{2+}$  を含む水の移動をモニターする。

### (2) マイクロアレイ解析による和合受粉関連遺伝子の探索

シロイヌナズナでは、受粉後5分で吸水がはじまり、10分後には吸水が終了、15分後に花粉の発芽がはじまる。そこで、吸水時に変動する遺伝子を探索するために、受粉直後をコントロールとし、受粉後15分の柱頭

をサンプルとしてRNAを抽出してマイクロアレイを行った。

しかし上記の方法では、花粉のRNAが含まれるために、花粉の遺伝子変動を解析してしまう可能性がある。これまでの実験結果で、受粉初期の反応は花粉表層物質単独で誘起されている。そこで、花粉のRNAの影響を回避するために、大量の花粉から花粉表層物質を単離し、花粉表層物質塗布前と塗布後15分の柱頭についてマイクロアレイ解析を行った。

一方、乳頭細胞では花粉の接触などの物理的刺激により発現上昇する遺伝子も存在することが予測される。そこで、シクロヘキサン処理により花粉表層物質を除去した花粉を受粉させた柱頭についてもマイクロアレイ解析を行った。以上の解析結果から、受粉初期に変動する遺伝子を探索した。

## 4. 研究成果

### 「和合受粉シグナル」の探索のためのバイオアッセイ系の構築

#### ① $\text{Ca}^{2+}$ センサータンパク質を用いた高感度 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの構築

乳頭細胞と花粉の細胞質、小胞体それぞれについて、YC3.60およびYC4.60の高発現体がそれぞれ数株得られた。

乳頭細胞の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングについては、花粉の吸水が終了し、花粉管が発芽する時期や、花粉管が乳頭細胞に侵入する時期に大きな変動がみられた。さらに、花粉表層物質単独でも  $\text{Ca}^{2+}$  変動が誘起されることが示され、 $\text{Ca}^{2+}$  を介したシグナル伝達系の存在が示唆された。また、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングからは、和合受粉後、細胞内における小胞体の配置が変化して花粉の発芽・侵入部位に集積すること、集積した小胞体内では  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高く保たれていることが示唆された。

一方、花粉の細胞質については、吸水前には  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は高く一様に分布しているが、受粉後、吸水により濃度が低下した後、乳頭細胞との接触部位で濃度上昇がみられ、その後上昇した部位から花粉管が発芽すること、乳頭細胞を伸長している花粉管先端では、花粉管伸長に必須であると考えられてきたオシレーションが見られないことが明らかになった。また、小胞体については、伸張している花粉管では、常に  $100 \mu\text{M}$  以上の濃度に保たれていて、シクロピアゾン酸処理により濃度が低下し、同時に花粉管伸張も停止することが明らかとなった。従って、小胞体にはシクロピアゾン酸感受性の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase が存在し、この分子が花粉管伸長に関わっていることが示唆された。

## ② 蛍光指示薬による細胞外Ca<sup>2+</sup>イメージング

乳頭細胞にカルシウムグリーンを塗布後花粉表層物質を付着させたところ、花粉を付着させたときと同様、蛍光の上昇が認められた。また、花粉表層物質を熱処理、あるいはプロテアーゼ処理した場合には、このような蛍光の上昇がみられなかった。以上の結果から、和合受粉シグナルにはタンパク質性のものが含まれている可能性が示唆された。

以上の①、②のモニタリング系を用いることで和合受粉時における細胞内および細胞内のCa<sup>2+</sup>動態のモニターが可能であることが示された。今後、花粉表層物質を大量に採取し、脂質性の画分とタンパク質性の画分に分けてアッセイすることにより、和合シグナルの性状解析を明らかにしたい。

## (2) マイクロアレイ解析による和合受粉関連遺伝子の探索

本研究では、「コントロール」あるいは「サンプル」とする柱頭から RNA を抽出し、コントロールの RNA を Cyanine 3-CTP (Cy3) で、サンプルの RNA を Cyanine 5-CTP (Cy5) で標識した。その後、両者を混合したものを Arabidopsis 3 Oligo Microarray スライド (Agilent) にハイブリダイゼーションさせた。スライド上の Cy3 と Cy5 の蛍光強度を数値化したものをそれぞれの signal 値とし、コントロールに対するサンプルの signal 比を ratio 値として各遺伝子の発現量変化を解析する指標とした。また、各マイクロアレイはそれぞれ 2 回の独立実験を行っており、2 回の結果において、一方が 1.8 以上の ratio 値を示し、もう一方が 2.0 以上の ratio 値を示す遺伝子を、有意に発現が誘導されたものとした。

最初に、野生株花粉の受粉直後の柱頭をコントロールとし、受粉 15 分後の柱頭をサンプルとしたマイクロアレイを行なった。その結果、野生株花粉を受粉させて 15 分後に発現が誘導された遺伝子を 433 個確認した。

花粉を用いたマイクロアレイでは、花粉における RNA の変動を見ている可能性が考えられた。そのため、花粉表層物質を花粉側試料として用いることで、花粉由来の RNA の影響を低くすることを考えた。また、前述のように、花粉表層物質を単独で乳頭細胞に塗布した際にも、乳頭細胞からの水の移動や Ca<sup>2+</sup>濃度の変動、アクチンの重合や活性酸素の発生といった、野生株花粉の受粉時と同様の生理変化が観察される。そこで、受粉時に花粉表層物質によって発現が誘導される雌側遺伝子を探索・解析することを目的として、未受粉の野生株柱頭をコントロールとし、花粉表層物質を塗布して 15 分後の柱頭をサンプルとしたマイクロアレイを行なった。その結果、花粉表層物質を塗布して 15

分後に発現が誘導された遺伝子は 449 個存在し、このうち 257 個は受粉後に発現上昇する遺伝子と共通するものであった。

次に花粉表層物質で発現上昇する遺伝子について機能別に分類して受粉後発現上昇する遺伝子と比較した結果、前者ではタンパク質分解に関与する遺伝子や、ストレス応答に関係する遺伝子の比率が高いことが示された。両者に共通するような遺伝子の中には、花粉の吸水に必須な遺伝子が含まれると考えられた。

前述のように、花粉に対してシクロヘキサン処理を施すことで、大部分の花粉表層物質を取り除けることが報告されている。このシクロヘキサン処理を施した花粉の受粉時には、花粉の吸水が起らず、乳頭細胞からの水の移動も見られない。このことから、このシクロヘキサン処理花粉を用いてマイクロアレイを行なうことで、水の移動前に発現が誘導される遺伝子あるいは水の移動とは関係なく発現が誘導される遺伝子を探索・解析することができると考えられた。そこで、シクロヘキサン処理を施した花粉を受粉させた直後の柱頭をコントロールとし、受粉 15 分後の柱頭をサンプルとしたマイクロアレイを行なった。その結果、シクロヘキサン処理花粉を受粉させた場合には 22 個の遺伝子しか発現が誘導されず、このうちの 18 個は無処理の花粉や花粉表層物質によっても誘導されるものであった。このことから、これら 18 個の遺伝子は水の移動前に発現が誘導される可能性が考えられた。

上記の花粉や花粉表層物質で発現誘導された遺伝子から、シクロヘキサン処理で誘導される遺伝子を差し引いた遺伝子は、239 個確認された。この中には Ca<sup>2+</sup>の輸送に関与するものや Ca<sup>2+</sup>を介したシグナル伝達に関与する calcium-dependent protein kinase、細胞壁の弛緩に関与する expansin family protein、エチレン応答性の ethylene-responsive element-binding factor などをコードする遺伝子が含まれていた。

一方で、受粉時特異的に発現量が減少する遺伝子についても、受粉—受精反応に関与している可能性が考えられた。本マイクロアレイ解析では、花粉の受粉後 15 分の柱頭において発現が抑制された遺伝子 (2 回の実験の ratio 値が共に 0.5 以下) を 146 個、シクロヘキサン処理花粉で抑制された遺伝子を 3 個、花粉表層物質塗布後 15 分に抑制された遺伝子を 42 個確認した。

以上の本研究のマイクロアレイの解析結果から、花粉の吸水が終了し、発芽が始まる受粉後 15 分の時期に発現変化する遺伝子が多数同定された。これらの中には、花粉の吸水・発芽に必要な水やイオンを乳頭細胞から花粉へ輸送する和合受粉に必須の遺伝子

が多数含まれていると考えられる。

今後は、これらの遺伝子の変動をリアルタイムPCR法や*in situ*ハイブリダイゼーション法で確認するとともに、これらの遺伝子の遺伝子破壊株の解析により受粉過程への関与を明らかにしたい。また、候補遺伝子については、GFPイメージングなどにより、和合受粉時の挙動を明らかにしていきたい。

#### 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5件)

① Takashi Kaneda, Yuri Taga, Ryota Takai, (他5名, 4番目), The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death, *EMBO Journal*, Vol.28, 926-936, 2009, 査読有

② Megumi Iwano, Tetsuyuki Entani, Hiroshi Shiba, (他8名, 1番目), Fine tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth, *Plant physiology*, in press, 査読有

③ Hiromi Tajima, Yuji Iwata, Megumi Iwano, (他2名, 3番目), Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.374, 242-247, 2008, 査読有

④ Megumi Iwano, Hiroshi Shiba, Kyoko Matoba (他8名, 1番目), Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during Self- and Cross-Pollination, *Plant Physiology*, Vol.144, 72-81, 2007, 査読有

⑤ Mitsuru Kakita, Kohji Murase, Megumi Iwano, (他5名, 3番目), Two distinct forms of M-Locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with s-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*, *Plant Cell*, Vol.19, 3961-3973, 2007, 査読有

[学会発表] (計11件)

① 岩野恵, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物の受粉過程において機能するアクアポリンの探索, 第50回植物生理学会, 2009.3.21, 名古屋市

② 岩野恵, 杉村真理, 小川宣仁, 大原圭子, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物の受粉時におけるアクアポリンの役割, 農芸化学会2009年度大会, 2009.3.29, 福岡市

③ 垣田満, 村瀬浩司, 岩野恵, 柴博史, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物の自家不和

合性に関わる膜結合型キナーゼ MLPK の機能解析, 日本植物生理学会第49回年会, 2008.3.22, 札幌市

④ 岩野恵, 柴博史, 円谷徹之, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物の受粉・受精過程における花粉管 Ca<sup>2+</sup>のモニタリング, 2008年度日本農芸化学会大会, 2008.3.28, 名古屋市

⑤ 岩野恵, アブラナ科植物の自家不和合性の形態学的・生理学的解析, 第24回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2008.5.17, 横須賀市

⑥ 永井里奈, 岩野恵, 梶村直子, 長谷川紀昭, 鷹岡昭夫, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物乳頭細胞の三次元電子線トモグラフィによる解析, 第24回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2008.5.18, 横須賀市

⑦ 岩野恵, 柴博史, 円谷徹之, 磯貝彰, 高山誠司, 受粉過程における花粉と乳頭細胞のCa<sup>2+</sup>ダイナミクス, 第72回植物学会, 2008.9.27, 高知市

⑧ 岩野恵, 磯貝彰, 高山誠司, 免疫組織化学法によるアブラナ科植物受粉過程の解析, 第49回組織細胞化学会, 2008.10.5, 長崎市

⑨ Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Takaoka, A., Isogai, A. and Takayama, S. Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination, 9th Asia Pacific Microscopy Conference, 2008.11.4, Jeju, Korea

⑩ 岩野恵, 分子をみる一植物細胞におけるアクチンフィラメント可視化への試み, 第23回医学生物学電子顕微鏡技術学会ワークショップ, 2007.5.20, 北九州市

⑪ 岩野恵, 的場京子, 長谷川紀昭, 竹村光一, 鷹岡昭夫, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物乳頭細胞液胞の3次元構造の解析, 第23回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2007.5.20, 北九州市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 恵 (IWANO MEGUMI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 50160130

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし