

令和元年6月18日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04385

研究課題名（和文）花粉管の伸長や誘引に関わる生理活性物質とその受容機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of pollen tube guidance factors

研究代表者

金岡 雅浩（Kanaoka, Masahiro）

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：10467277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 16,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、雌組織から分泌される新規花粉管誘引物質の同定と性質の解析、ケミカルスクリーニングによる花粉管の伸長や誘引に関わる新規化合物の同定とその作用機序の解明、新規に発見した花粉管誘引因子及び上記で同定した新規花粉管誘引因子の花粉管における受容体の探索を目的とした。長距離花粉管誘引因子をトレニアより新規に同定し、その組織内分布を明らかにした。また、助細胞由来の誘引因子LUREsについて、複数種のLUREsの配列比較より、種特異的な花粉管誘引に必要な部位を絞り込むことに成功した。さらに、これまで花粉管ガイダンスや受精研究に用いられてこなかった植物でin vitro受精実験系を立ち上げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉管誘引に関わる因子を同定し、その性質を明らかにすることは、植物の受精を理解する上できわめて重要である。本研究において複数の誘引因子の性質が明らかになったことは、植物の受精を理解する上で重要であるのみならず、将来的には異種間交配といった育種場の応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research period, I have analyzed the function of pollen tube attractant proteins and established in vitro pollen tube guidance assay system in novel plant species.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：花粉管 受精 有性生殖 多様性

1. 研究開始当初の背景

花粉管は花粉から発芽して先端成長により伸長する細胞である。被子植物の雄性配偶体である精細胞は移動能力をもたない細胞であり、雌しべ内部を伸長する花粉管によって、胚珠の胚のう(雌性配偶体)へと運ばれる。花粉管の伸長方向を制御する機構を花粉管誘引と呼ぶ。金岡らはトレニア(*Torenia fournieri*)を用いて、胚のうの助細胞から分泌される花粉管誘引因子 LUREs を初めて報告した。また、近年、独自に開発したマイクロ流体デバイスによる花粉管誘引アッセイ系を用いて、胚珠の胞子体組織由来の新規誘引因子を生化学的手法により同定した。しかしながら、これら誘引因子の花粉管における受容機構は明らかでない。

花粉管は胚珠に到達する以前にも雌しべ組織と相互作用する。ユリでは花柱由来の分泌タンパク質が花粉管と花柱組織との接着に関わると報告されているが、柱頭や花柱での花粉管誘引に関わる因子についての知見はほとんどない。また、花柱を通過した花粉管と通過していない花粉管では遺伝子発現が大きく異なることが分かった。花柱を通過していない花粉管は LUREs に誘引されないことから、花粉管の遺伝子発現の変化は誘引因子への応答に重要だと考えられた。近年、2糖を基本骨格とする糖の一種である AMOR がこの変化に関わる可能性が示唆され、低分子化合物による花粉管の生理状態の制御に興味を持たれている。しかしながら、花粉管の誘引や忌避、誘引の阻害に働く化合物は世界的にみても知られていない。

2. 研究の目的

本研究は、トレニアを用いて新規花粉管誘引因子や誘引因子の受容体を同定することにより、花粉管の伸長方向を制御するシグナル分子とその受容機構を総合的に理解することを目的とした。また、花粉管誘引実験系の確立されていない植物において実験系を確立すること、花粉管に関わる新規の因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 独自のアッセイ系を用いた新規花粉管誘引物質の同定と性質の解析

マイクロ流体デバイスを用いた花粉管誘引アッセイ系を開発し、新規誘引因子をトレニア胚珠抽出液から同定した。この系を利用して、様々な雌組織の花粉管誘引活性を測定し、その活性を担う分子の同定を目指す。

(2) ケミカルスクリーニングによる花粉管の伸長や誘引に関わる新規化合物の同定とその作用機序の解明

花粉管に作用する低分子化合物は AMOR 以外にも存在すると考えられる。そこで、分担研究者の佐藤博士の協力により、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(以下 ITbM と略)が所有するケミカルライブラリーの化合物を用いて、花粉管の伸長や誘引に影響を及ぼす化合物を探索し、構造活性相関解析によりそれらが花粉管にどのように機能しているかを明らかにする。

(3) 新規モデル植物での in vitro 花粉管誘引アッセイ系の立ち上げ

植物種間における花粉管誘引因子の普遍性・多様性を理解するために、これまで因子が明らかになっていない分類群の植物において花粉管誘引のアッセイ系を確立し、因子の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) 独自のアッセイ系を用いた新規花粉管誘引物質の同定と性質の解析

独自に開発した花粉管誘引アッセイ用マイクロデバイス(Horade and Kanaoka et al., 2013)を用いて、トレニアにおける新規の花粉管誘引因子を探索した。胚珠由来の抽出液を生化学的に分離し、画分ごとの活性を評価することで絞り込み、質量分析により候補タンパク質を得ることができた。質量分析の情報を元に発現精製させたタンパク質に誘引活性がみられたので、CALL1 と名付けた。CALL1 は被子植物に保存された新規の分泌タンパク質であり、他の植物種のオルソログと思われるタンパク質にもその種で誘引活性が見られた。

また、これまでに明らかになっている花粉管誘引因子、シロイヌナズナの AtLURE とトレニアの TfLURE はどちらも同じファミリーに属するタンパク質である。アミノ酸配列上の保存性は低いが、どちらも同種の花粉管を誘引することから、その構造に共通性があるのではないかと考えた。そこで、両タンパク質の配列を部分的に入れ替えたキメラタンパク質を作製し、それぞれの種の花粉管を誘引できるかどうか調べた。その結果、両タンパク質の特定の部位のいくつかのアミノ酸を入れ替えると、花粉管誘引活性が変化することが分かった(図1)。この結果は、花粉管誘引因子のタンパク質の中で、花粉管との相互作用に重要な領域を明らかにするとともに、人工的な誘引因子作製の道を開くものであり、大変興味深い。

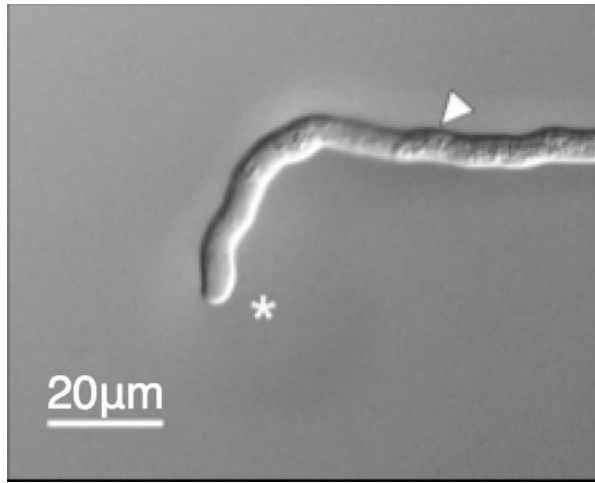


図1 .キメラタンパク質による花粉管誘引アッセイ。花粉管の先端は培地上に置いたキメラタンパク質(＊)の方に伸長方向を変化させた。

(2) ケミカルスクリーニングによる花粉管の伸長や誘引に関わる新規化合物の同定とその作用機序の解明

ITbM 独自の化合物を含む化合物ライブラリーを用いて、花粉管の伸長や方向性制御に影響を与える化合物のスクリーニングをおこなった。現在までにおよそ 1000 化合物を花粉管に与えており、花粉管を誘引する化合物は得られていないが、8 化合物で花粉管に異常が観察された。化合物添加による表現型は、花粉管の破裂がもっとも多く、ついで花粉管がまっすぐに伸長しなくなるという異常が多く見られた。興味深い表現型として、化合物 D8 を胚珠とともに加えると、花粉管が胚珠の方へ誘引されなくなるという現象が観察された(図2)。これは、D8 が胚珠からの誘引物質と競合して花粉管の誘引を阻害している可能性を示唆している。

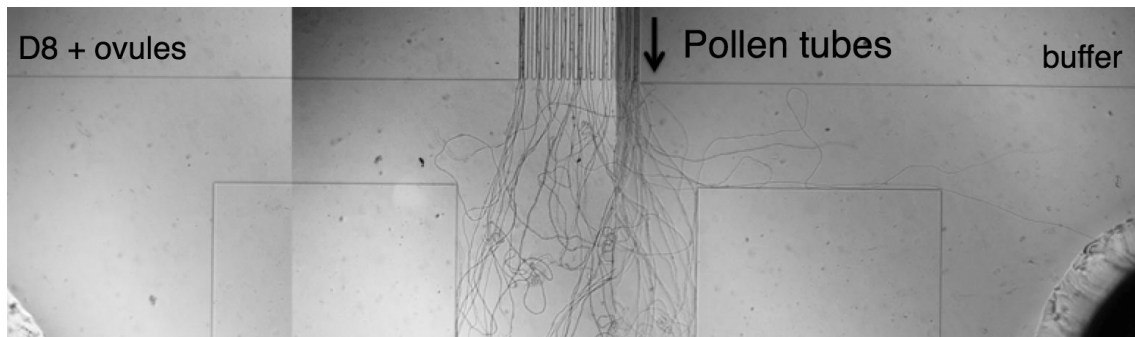


図2 .化合物によるアッセイ。胚珠とともに D8 を加えると(左側)、花粉管は胚珠の方へ曲ることができず、まっすぐ伸長してしまう。

(3) 新規モデル植物での in vitro 花粉管誘引アッセイ系の立ち上げ

これまでに知られている花粉管誘引因子はシロイヌナズナの AtLURE とトレニアの TflLURE、それにトウモロコシの ZmEA1 のみである。AtLURE と TflLURE はどちらもディフェンシン様のシステインに富んだタンパク質であり、ZmEA1 は EA1 ドメインをもつ小さな分泌タンパク質である。AtLURE と TflLURE には構造上の類似性はあるが、ZmEA1 とは類似性はまったくみられない。そこで、誘引因子として働く因子に普遍的な特徴があるのか、それとも植物の分類群ごとにまったく異なる因子が使われているのかを明らかにするために、これまで花粉管や受精研究に用いられていなかった分類群の植物を用いて、因子の単離を目指すことにした。そのために、まず、in vitro で花粉管や胚珠を培養するための培地の条件を検討した。植物の花粉管培養に用いられる複数の培地を参考にして、独自に培地の組成を検討し、この植物でも花粉管と胚珠とを培地上で培養することに成功した。さらに、培地上においた胚珠の方に花粉管が誘引される様子も観察することができた。また、胚珠から RNA を抽出し m 胚珠で発現している遺伝子を網羅的に探索した。その中でいくつかの遺伝子については、in situ mRNA hybridization により、胚のうで発現していることを確認した。以上より、この方法で新規の植物より花粉管誘引因子を探索するための準備ができたと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Akane Takemori, Akiyo Naiki, Ko-Ichi Takakura, Masahiro M Kanaoka, Sachiko Nishida (2019) "Comparison of mechanisms of reproductive interference in *Taraxacum*." *Annals of botany*, 20, 1-11. 査読有り
2. Keita Muro, Kumi Matsuura-Tokita, Ryoko Tsukamoto, Masahiro M Kanaoka, Kazuo Ebine, Tetsuya Higashiyama, Akihiko Nakano, Takashi Ueda (2018) "ANTH domain-containing proteins are required for the pollen tube plasma membrane integrity via recycling ANXUR kinases" *Communications biology*, 1, 152. 査読有り
3. Takashi Tsuchimatsu, Hiroyuki Kakui, Misako Yamazaki, Cindy Marona, Hiroki Tsutsui, Afif Hedhly, Dazhe Meng, Yutaka Sato, Thomas Stadler, Ueli Grossniklaus, Masahiro M Kanaoka, Michael Lenhard, Magnus Nordborg, Kentaro K Shimizu (2018) "Adaptive Reduction of Male Gamete Number in a Selfing Species" *bioRxiv*, 272757. 査読無し
4. Masahiro M Kanaoka (2018) "Cell-cell communications and molecular mechanisms in plant sexual reproduction" *Journal of plant research*, 131, 37-47. 査読有り
5. Nan Luo, An Yan, Gang Liu, Jingzhe Guo, Duoyan Rong, Masahiro M Kanaoka, Zhen Xiao, Guanshui Xu, Tetsuya Higashiyama, Xinping Cui, Zhenbiao Yang (2017) "Exocytosis-coordinated mechanisms for tip growth underlie pollen tube growth guidance" *Nature communications*, 8, 1687. 査読有り
6. Sachiko Nishida, Keisuke Hashimoto, Masahiro M Kanaoka, Ko-Ichi Takakura, Takayoshi Nishida (2017) "Variation in the strength of reproductive interference from an alien congener to a native species in *Taraxacum*" *Journal of plant research*, 130, 125-134. 査読有り
7. Takashi Tsuchimatsu, Hiroyuki Kakui, Misako Yamazaki, Masahiro M Kanaoka, Ueli Grossniklaus, Afif Hedhly, Cindy Marona, Meng Dazhe, Yutaka Sato, Thomas Stadler, Hiroki Tsutsui, Michael Lenhard, Magnus Nordborg, Kentaro K Shimizu (2016) "Evolutionary reduction of male gamete number in predominantly selfing *Arabidopsis thaliana*" *GENES & GENETIC SYSTEMS*, 91, 322. 査読有り
8. Masahiro M Kanaoka, Tetsuya Higashiyama (2015) "Peptide signaling in pollen tube guidance" *Current opinion in plant biology*, 28, 127-136. 査読有り
9. Hidetaka Kaya, Megumi Iwano, Seiji Takeda, Masahiro M Kanaoka, Sachie Kimura, Mitsutomo Abe, Kazuyuki Kuchitsu (2015) "Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in *Arabidopsis*" *Plant signaling & behavior*, 10, e989050. 査読有り

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 金岡 雅浩 (2018) 植物の受精と種間障壁を担う花粉管誘引因子の機能と多様性, 日本発牛生物学会 秋季シンポジウム 2018
2. 金岡 雅浩 (2018) 植物のオスとメスはどのようにしてお互いを認識するのか? 第 6 回

生態進化発生コロキウム

3. 金岡 雅浩、神谷 直、塚本 涼子、東山 哲也 (2017) 種選択的な花粉管ガイダンスに関わる誘引物質 LUREs の機能解析 日本植物学会第 81 回大会 東京理科大学

〔図書〕(計 1 件)

(翻訳) 植物生理学・発生学 テイツノザイガー著、西谷和彦ノ島崎研一郎 監訳、講談社(2017)
(第 19 章を分担して翻訳)

〔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.higashiyama-lab.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤綾人

ローマ字氏名：Sato, Ayato

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：トランスフォーマティブ生命分子研究所

職名：特任准教授

研究者番号(8桁)：10512428

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：塚本 涼子

ローマ字氏名：Tsukamoto, Ryoko

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。