

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02456

研究課題名(和文)植物のポジティブな花粉排除機構の解明

研究課題名(英文)Active rejection of heterospecific pollen by the pistils

研究代表者

藤井 壮太(Fujii, Sota)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：90716713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の異種排除メカニズムに関わる分子機構の解明を目指した。その結果新たな因子として、TBLと呼ばれる細胞壁のアセチル化酵素を見出し、細胞壁の化学修飾が種間の生殖障壁として機能する可能性を見いだした。また、種間不和合性に関わるSPR11タンパク質の機能解析を行い、分子内あるいは分子間のジスルフィド結合が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、SPR11タンパク質が自身のホモマルチマーを含む複合体に局在することを明らかにした。これらの成果から、異種排除のメカニズムの理解が更に進む事が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本学術成果は、生物種間の生殖相互作用に関わるものである。本研究で見出した新しい因子群は、実際の生態系においても生殖障壁として機能する可能性も考えられ、重要な生理的意義をもつものと考えられる。また、農学上においては、種間ハイブリッドの人為制御などについて数多くの研究がなされてきた。本研究で見出した因子はそれらの応用的な側面においても意義深いものであり、これらの因子を標的にすることで人為的なハイブリッド作成技術の礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms underlying the interspecific incompatibility mechanism in plants. As a result, we identified a new factor, an acetylation enzyme of the cell wall called TBL, and found that chemical modification of the cell wall may function as a reproductive barrier between different species. We also conducted a functional analysis of the SPR11 protein, which is involved in interspecific incompatibility, and revealed that intra- or intermolecular disulfide bonds play an important role. Furthermore, we showed that the SPR11 protein is localized in a complex containing its own homomultimer. These findings are expected to further advance our understanding of the mechanisms of interspecific pollen rejection.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：雌蕊 花粉 受粉 ライブイメージング 化合物制御

1. 研究開始当初の背景

生物学では「種分化」そして「種障壁」という概念がある。例えば植物では生殖過程に種の壁がある事が知られている。Stebbins (1958)は植物の生殖隔離機構を分類し、花粉と雌蕊の相互作用の場である受粉や、受精後の胚発生が種間交雑のボトルネックとなることを議論した。しかし「種分化」や「種障壁」という概念は古くから確立されていたにも関わらずその分子実体の多くは解明されていない。

例えば、植物では花粉管と胚珠の相互作用において種障壁があることが報告されている。花粉管は膜に局在する受容体によって、助細胞から放出される低分子タンパク質 LURE を感知することで胚珠へと誘引される(Takeuchi & Higashiyama 2016)。LURE は同種の花粉のみを強く惹きつけるため(Takeuchi & Higashiyama 2012)、種障壁になると考えられている。また、受精後の胚発生の過程ではゲノムインプリンティングが種障壁となる。ゲノムインプリンティングではポリコム複合体によるエピジェネティック制御が鍵を握っている。複合体は量的に制御されており、その異所的な発現は胚致死性を引き起こす。実際、アブラナ科植物でもポリコム複合体の構成要素が雑種致死性の原因となることがわかっており(Tonosaki et al 2013)、種に固有の複合体制御が種障壁を生み出している。

これまでの研究で、研究代表者はポジティブな花粉排除機構の一部と考えられる遺伝子を見出した。SPRI1 (Stigmatic Privacy 1)と命名したこの因子は雌蕊で特異的に発現する遺伝子である。シロイヌナズナの SPRI1 欠損変異体は稔性を含め通常の生育に問題は見られないが、近縁種の花粉管の侵入を許してしまう(Fujii et al Nat Plants 2019) (図 2)。すなわち花粉管の侵入を負に制御する遺伝子が存在し、植物が gain-of-function 型の花粉排除機構を備えていることを示唆している。

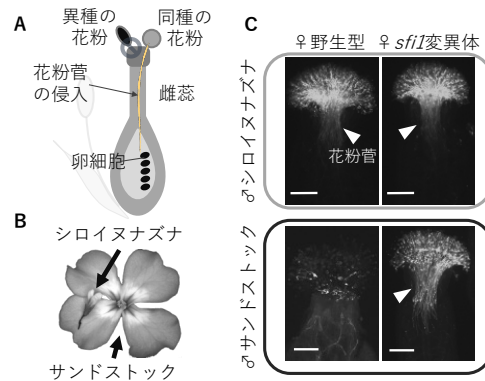


図 1 本研究の背景

2. 研究の目的

従って本研究では研究代表者のこれまでの発見を踏まえ、ポジティブな花粉排除メカニズムの分子生理基盤を探索する。SPRI の発見は、異種排除メカニズムを人為的に破壊できる事を示唆している。そのためシンプルな順遺伝学や薬理学手法によって防御機構の他要素を同定できると期待する。更に、本生理メカニズムの存在は異種の花粉に対して雌蕊で何らかの細胞応答が起きることを示唆する。本研究ではライブイメージングなどを用いて、異種花粉と接着時に雌蕊で起こる細胞シグナル伝達の基礎知見を得る。

3. 研究の方法

(i) ポジティブな花粉排除機構の新奇遺伝変異のスクリーニング

順遺伝学の定法に則る。花粉親として、SPRI1 遺伝子を見出す際に用いたシロイヌナズナの近縁種サンドストック (*Malcolmia littorea*) を用いて、花粉管の侵入を許してしまう変異体をシロイヌナズナの変異源処理種子プールからスクリーニングする。spril1 変異体が再同定されるはずであり、スクリーニングの飽和度の指標として利用できる。高速シーケンサーを用いて原因遺伝子を同定し、相補性試験を行う。また、シロイヌナズナ種内の遺伝的多様性も利用できると期待している。見出された遺伝子の生化学的な機能解析を行うことでポジティブな花粉排除機構に関わる新奇分子の同定を目指す。

(ii) 花粉排除機構を打破する化合物のスクリーニング

イオンチャネルなど細胞シグナル伝達系を標的とするケミカルライブラリーから、花粉排除機構に影響を及ぼす化合物を探索する。薬剤をシロイヌナズナ雌蕊に処理したのち、サンドストックの花粉を受粉し、花粉管の侵入が見られる条件を探索する。なお、これまでアブラナ科植物の自家不和合性の研究より、カルシウム輸送体の阻害剤、細胞内 pH に影響を与えるカルボン酸やアクチン重合の阻害剤などを雌蕊に処理した際花粉の発芽に影響を与えることがわかっている(Iwano et al 2007; Iwano et al 2015; Fujii unpublished)。自家不和合性と、本計画が研究対象とする花粉排除機構との相違性を調べるため、これらの化合物を処理して影響を調査する。影響を与える化合物が見出された場合、ゲノム編集によって薬剤の標的候補遺伝因子を破壊し、花粉排除機構に与える影響を精査する。

(iii) ライブイメージングによる異種花粉応答反応の解明

同種の花粉を受粉した際、雌蕊先端の細胞では様々な生理応答反応が起こることがわかっている(Iwano et al. 2015; Fujii unpublished)。例えばカルシウムイオンは花粉の吸水、発芽などに応答して増加することがわかっている。サンドストックの花粉をこれまでの研究で作成し

た雌蕊のカルシウムや細胞骨格の可視化ラインに受粉し、野生型と *spr11* と比較することで花粉排除機構がどのような細胞の生理応答を引き起こすのかを明らかにする。さらに研究代表者はアブラナ科植物のコレクションを有している。様々な近縁種を花粉親として用いることで種の遺伝的距離と生理応答反応との間に関連性を見出せると考えている。この解析により花粉排除機構の基礎生理的な知見が深められると考えている。

4. 研究成果

(i) ポジティブな花粉排除機構の新奇遺伝変異のスクリーニング

研究期間内に、SPRI1 の単離同定について報告した (Fujii et al Nat Plants 2019)。その後、シロイヌナズナ種内の遺伝的多様性に基づいて、種間不和合性を制御する因子 TBL40 と TBL45 を見出した。TBL40 と TBL45 は細胞壁のキシランのアセチル化に関わる酵素である。これらの酵素を破壊した二重変異体は異種花粉の排除能力が低下しており、細胞壁の化学修飾が異種花粉の排除メカニズムにおいて重要な役割を果たすことが期待された。tbl 変異体は顕著な形態的異常を示さなかったため、細胞壁は生理的な花粉排除機構として機能することが示唆された。さらに、異種花粉排除に関わる因子として、zinc-finger 型転写因子である SPRI2 を新たに見出した。SPRI2 は TBL40 と TBL45 の遺伝子領域に直接結合し、これらの遺伝子の転写発現を正に制御することが示唆された。現在、この成果を論文としてまとめ、Research Square に preprint としてアップロードしたと同時に、査読を受けているところである。

(ii) 花粉排除機構を打破する化合物のスクリーニング

本研究ではケミカルスクリーニングを行い、800 の化合物が種間不和合性に与える影響を調査した。しかし、異種花粉排除に強い影響を与える化合物を得ることができなかった。これは、異種花粉の鍵因子である SPRI1 の生化学性質の理解が不十分であることが一因であり、本ターゲットの理解の深化が必要であると考えられた。そこでケミカルスクリーニングに向けて、100 種類異常の SPRI1 のアミノ酸置換体の機能解析を行った。その結果、SPRI1 の機能に重要であるアミノ酸部位を特定することができた。

例えば、アミノ酸 67 番目と 80 番目のシステインは SPRI1 の機能に非常に主要な役割を果たすことが明らかとなった。これらの結果から、C67 や C80 同士で分子間架橋を形成する可能性 (図 3) や、C67 と C80 との間で分子内の架橋が形成されることが示唆された。現在、この成果をまとめ、論文として投稿準備中である。

(iii) ライブイメージングによる異種花粉応答反応の解明

超解像顕微鏡を用いた SPRI1 のライブイメージング解析により、SPRI1 は細胞膜上で粒状の構造を形成することが明らかとなった。ここで、SPRI1 は四回膜貫通型のタンパク質であるが、SPRI1 が足場タンパク質となって細胞膜状で複合体が形成され、異種花粉リジェクト能力が作られているという可能性が考えられた。蛍光退色回復法によって細胞内における SPRI1 の動態を調査したが、他の細胞膜局在性マーカーと比較して有意な動態性の違いは見出されなかった。一方、SPRI1 の生化学的な特性を調査したところ、雌蕊において 300 KDa 程度の複合体を形成することが明らかになった。この複合体には複数の SPRI1 分子による SPRI1 マルチマーが含まれると同時に、その他の分子が存在することも示唆された (図 3)。現在、この成果をまとめ、論文として投稿準備中である。

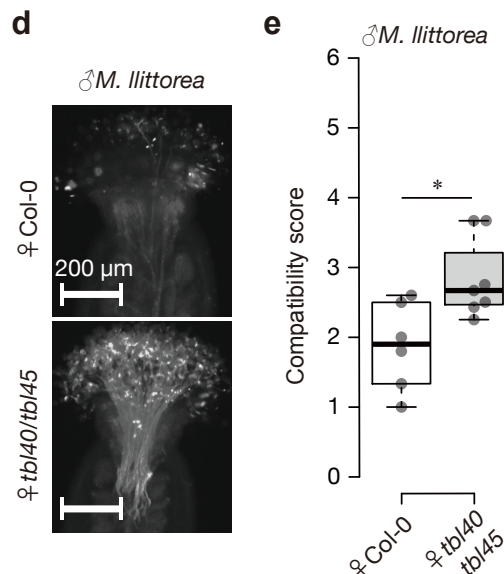


図 2 *tbl40/tbl45* 二重変異体の表現型

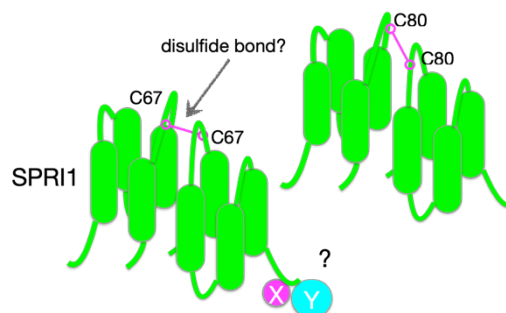


図 3 推定される SPRI1 の作用機作

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tangpranomkorn Surachat, Igarashi Motoko, Ishizuna Fumiko, Kato Yoshinobu, Suzuki Takamasa, Fujii Sota, Takayama Seiji	4. 巻 -
2. 論文標題 A land plant specific VPS13 mediates polarized vesicle trafficking in germinating pollen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 1-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.11.01.514778	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sota, Yamamoto Eri, Tangpranomkorn Surachat, Kimura Yuka, Miura Hiroki, Yamaguchi Nobutoshi, Niidome Maki, Shimosato-Asano Hiroko, Kato Yoshinobu, Wada Yuko, Ito Toshiro, Takayama Seiji	4. 巻 -
2. 論文標題 A phase-separated transcription factor regulates an interspecific barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 biorxiv	6. 最初と最後の頁 1-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-2015853/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sota	4. 巻 32
2. 論文標題 Plant physiology: ATP at the center of self-recognition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R962 ~ R964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.08.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchimatsu T, Fujii S	4. 巻 377
2. 論文標題 The selfing syndrome and beyond: diverse evolutionary consequences of mating system transitions in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phil. Trans. R. Soc. B	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rstb.2020.0510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yoshinobu, Fujii Sota	4. 巻 13
2. 論文標題 An MAPK Pathway in Papilla Cells for Successful Pollination in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1539 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2020.10.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sota, Shimosato-Asano Hiroko, Kakita Mitsuru, Kitanishi Takashi, Iwano Megumi, Takayama Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Parallel evolution of dominant pistil-side self-incompatibility suppressors in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1404 ~ 1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15212-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sota, Takayama Seiji	4. 巻 6
2. 論文標題 Expanding the RNase world	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 53 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-020-0596-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sota, Tsuchimatsu Takashi, Kimura Yuka, Ishida Shota, Tangpranomkorn Surachat, Shimosato-Asano Hiroko, Iwano Megumi, Furukawa Shoko, Itoyama Wakana, Wada Yuko, Shimizu Kentaro K., Takayama Seiji	4. 巻 5
2. 論文標題 A stigmatic gene confers interspecies incompatibility in the Brassicaceae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 731 ~ 741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0444-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sota Fujii, Yoko Shiroto	4. 巻 69
2. 論文標題 Molecular identification of the causal locus for the petaloid phenotype in <i>Daucus carota</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 186-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.18120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤井壮太, 高山誠司	4. 巻 7
2. 論文標題 被子植物における自他の花粉の識別システムおよびその進化の動態	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ライフサイエンス領域融合レビュー	6. 最初と最後の頁 e006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7875/leading.author.7.e006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤井壮太
2. 発表標題 植物の生殖におけるゲノムと分子のダイナミクス
3. 学会等名 第2回核酸研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Surachat Tangpranornkorn, Motoko Igarashi, Fumiko Ishizuna, Yoshinobu Kato, Takamasa Suzuki, Sota Fujii, Seiji Takayama.
2. 発表標題 The plant-specific Arabidopsis VPS13a mediates polarized vesicle trafficking during pollen germination.
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦大樹、木村友香、和田七夕子、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 花柱のシステインリッチペプチドがもたらすシロイヌナズナの多次元種間障壁
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田所駿、加藤義宣、石田翔太、木村友香、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 アブラナ科種間不和合性因子SPR11におけるシステイン残基の生化学的な機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤義宣、木村友香、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 クチクラはアブラナ科花粉の発芽プロセスを制御することで種間生殖障壁として機能する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Surachat Tangpranorkorn, Motoko Igarashi, Fumiko Ishizuna, Yoshinobu Kato, Takamasa Suzuki, Sota Fujii, Seiji Takayama.
2. 発表標題 The plant specific Arabidopsis VPS13a mediates pollen grain polarization during pollen germination.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤義宣、木村友香、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 アブラナ科生殖障壁としてのクチクラ層の機能
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤星太郎、山本絵里、Surachat Tangpranomkorn、木村友香、加藤義宣、新留真紀、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 アブラナ科植物における種間不和合性制御因子SPR12局在構造体の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田所駿、加藤義宣、石田翔太、木村友香、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 シロイヌナズナの種間不和合性を担う因子SPR11の機能メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦大樹、木村友香、和田七夕子、高山誠司、藤井壮太
2. 発表標題 シロイヌナズナ花柱において受精前障壁を引き起こす新規システインリッチペプチドの同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 壮太
2. 発表標題 植物生殖において異種間受精を防ぐ分子メカニズム
3. 学会等名 第23回日本進化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 壮太
2. 発表標題 植物生殖における異種間細胞相互作用の分子メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sota Fujii
2. 発表標題 Molecular rejection mechanisms of pollen in pistils
3. 学会等名 International Conference on Arabidopsis Research 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshinobu Kato, Shota Ishida, Yuka Kimura, Shun Tadokoro, Seiji Takayama, Sota Fujii
2. 発表標題 アブラナ科植物の異種花粉排除に関わる雌蕊 SPR11 タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井壮太
2. 発表標題 花粉発芽におけるシロイヌナズナ VPS13 タンパク質の分子機能について
3. 学会等名 植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井壮太
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析による 異種花粉識別分子の発見
3. 学会等名 種生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sota Fujii
2. 発表標題 A molecular mechanism that rejects pollen from foreign species
3. 学会等名 International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井壮太
2. 発表標題 異種の花粉を選択的に排除する分子メカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	和田 七夕子 (Wada Yuko) (50379541)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------