

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06281

研究課題名(和文)花粉壁エキシンの立体構造の構築における多糖の役割

研究課題名(英文) Roles of polysaccharides in the development of pollen exine 3D structure

研究代表者

石黒 澄衛 (Ishiguro, Sumie)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50260039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花粉の表面は微細な立体構造で覆われている。これはエキシンと呼ばれ、花粉を保護する軽量かつ頑丈な構造である。エキシンの立体構造は植物の種ごとに固有であることから、遺伝子が規定する構造であるといえる。本研究では、シロイヌナズナが作る網目状のエキシンがどのようなしくみで作られるのかを調べた。その結果、キシラン、ペクチン、アラビノガラクトタンなどの多糖がエキシン形成初期の花粉の表面に規則的に配置されることを見出した。これらの多糖は発達中のエキシンの表面や空隙(網目)に存在すること、これらの多糖を作れない突然変異体はエキシンの構造が崩れることから、多糖がエキシン形成の鋳型として働くことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、生物が遺伝情報に基づいて種特異的な形を作るしくみの一端を解明したことである。生物の形作りにおいても、エキシンのように細胞の外に特定の構造を作るという現象は珍しい。細胞外に分泌された多糖が脂質性高分子化合物を成形する鋳型として働くという、これまで知られていなかったメカニズムが明らかになった。背景にあるのは分子の自己集合と自己組織化であり、直ちに応用展開できる成果ではないものの、自律的な組織形成に基づいた有用構造物の生産に資する基盤的な知見である。

研究成果の概要(英文)：Pollen grains of flowering plants are covered with elaborate 3D structures called exine, of which light and robust features are suitable for protecting male gametes. The exine structure is species specific, indicating that the structure is determined by genes. In this study, we focused on the mechanism how Arabidopsis makes their reticulate exine, especially on the function of polysaccharides. We found that xylan and pectin made a module and localized in the mesh of developing exine, whereas arabinogalactan proteins wrapped the exine net. The mutants deficient in these polysaccharides made collapsed exine. We concluded that the polysaccharides work as a frame of developing exine.

研究分野：植物生化学・発生生物学

キーワード：花粉 細胞壁 立体構造形成 多糖 突然変異体 シロイヌナズナ エキシンの スポロポレニン

1. 研究開始当初の背景

古生物学では、地層が形成された時期の植生を推定するのに花粉の化石が使われる。このことは、花粉の形態が多様かつ種固有であることを意味するとともに、花粉を覆う細胞壁が頑丈で分解されにくい性質を持つものであることを示している。一体どのようなしくみでこの花粉壁(エキシン)が作られるのかを明らかにするため、国内外のいくつかの研究グループがシロイヌナズナを材料に用いて研究を行った。エキシンの構造に異常をきたす突然変異体が収集され、その原因遺伝子の解析から、キシラン、ペクチン、アラビノガラクトタンパク質 (AGP) などの多糖がエキシンの構造形成に重要な働きを持つことが明らかにされた。しかし、これらの多糖がどのようなしくみでエキシンの立体構造の形成に関わるのかは全く理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究で対象とするキシラン、ペクチン、AGP は一般的な植物細胞壁を構成する多糖成分であるが、エキシンの主成分はポリフェノールやポリケチドなどの樹脂であり、多糖は含まれていない。その一方で、多糖を合成できない突然変異体はエキシンの構造の崩壊をもたらすと観察結果が得られたことから、多糖がエキシン構成の鋳型として働くのではないかと考えた。そこで、エキシンの形成が始まる花粉発達の初期に、多糖が花粉表面のどこに分布し、どのような構造を作っているのかを解明することを目的として研究を行った。さらに多糖が作れない突然変異体や、エキシンの構造が変化する突然変異体の解析を行い、多糖がエキシン形成において実際に鋳型として働いているのかどうかを検証することにした。

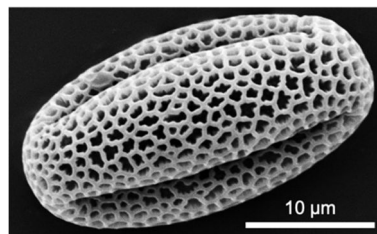
3. 研究の方法

キシラン、ペクチン、AGP にはそれぞれを特異的に認識するモノクローナル抗体があるので、それを用いて免疫組織化学的染色実験を行い、花粉表面に存在する多糖のモジュールを可視化した。エキシンの網目サイズが変わる変異体や網目が断裂する変異体などシロイヌナズナの各種突然変異体を用い、その原因遺伝子を同定した。さらに、原因遺伝子が多糖のモジュールにどのような影響を及ぼすのかを考察した。

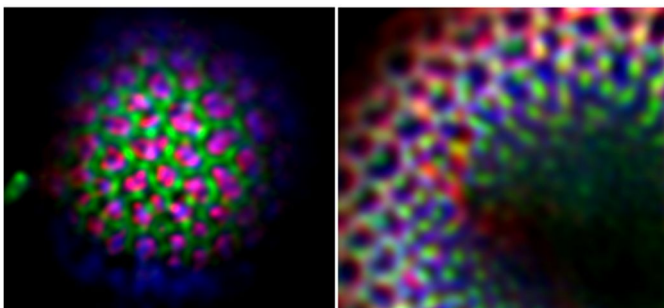
4. 研究成果

(1) 発達過程の花粉表面における多糖モジュールの可視化

一般に植物では花粉母細胞が減数分裂して生じた 4 個の未熟花粉 (小孢子) がすぐには分離せず、花粉四分子と呼ばれるカロース壁に囲まれた構造を作ってしばらく発達する。やがてカロース壁が分解されると、個々の小孢子は遊離小孢子となりさらに発達する。この過程におけるエキシンの発達をシロイヌナズナを用いて経時的に観察した結果、減数分裂直後には見られないが、四分子期の後期になると小孢子的細胞膜とカロース壁の隙間で形成が始まり、遊離小孢子になってから著しく発達する様子が観察できた。そこで、モノクローナル抗体を用いた免疫染色で、この過程でどこに多糖が存在するのかを解析した。まず花粉四分子から遊離した直後の小孢子を観察したところ、LM10 抗体で認識されるキシランは発達が進むエキシンの網の目(ラクナ)を埋めるように存在していた。JIM5 抗体で認識されるペクチン(低メチル化ホモガラクトツロナン)も同様にラクナに存在したが、キシランよりも細胞膜に近い側に認められ、キシランとは別々の層を作っていることが明らかになった。一方、MAC204 抗体で染色される AGP はラクナには存在せず、網状のエキシンの表面を覆うように、それ自身が網状の構造を作って存在していた。いずれの多糖も小孢子的発達 (= エキシンの発達) とともに染色が弱くなり、やがて消失した。AGP の場合は MAC204 抗体で認識される分子が減少する一方で別のモノクローナル抗体で認識される分子が増加する様子も認められ、多糖の構造はエキシンの発達過程でダイナミックに変化することが明らかになった。次に、花粉四分子期の小孢子について観察したところ、エキシンの形成に先駆けて粒状のキシランとペクチンが細胞膜とカロース壁の間に現れることが確認できた。これは以前からプライムエキシンと呼ばれていた



シロイヌナズナ成熟花粉の走査型電子顕微鏡像。網目状のエキシンが外表面全体を覆っている。網の目(穴)をラクナと呼ぶ。花粉の長軸方向に二列見える溝は発芽孔。



シロイヌナズナの微孢子 (遊離小孢子期初期) の免疫染色。
左: キシラン (赤)、ペクチン (青)、エキシン (緑)
右: AGP (赤)、ペクチン (青)、エキシン (緑)

構造であるが、キシランやペクチンが顆粒(モジュール)を形成して分布する様子を捉えたのは本研究が最初である。キシラン合成酵素の欠損変異体ではこのモジュールが消失するとともに、網目が詰まったエキシンが形成された。以上の結果より、キシランとペクチンはモジュールを形成し、エキシンの網目の目を作るのに寄与すると結論した。一方、AGPはカロース壁が消失した後もエキシンの表面を覆うことでエキシン表面が平滑さを保ったまま発達するのに寄与すると考えられる。

キシランを合成できない突然変異体ではペクチンも著しく減少していた。両者は小胞子内部で合成されて表面に分泌されると推定されており、少なくともペクチンの分布はキシランに依存していることが明らかになった。これに対し、タペート細胞で合成されて小胞子の表面に供給されるAGPの量には大きな変化はなかった。

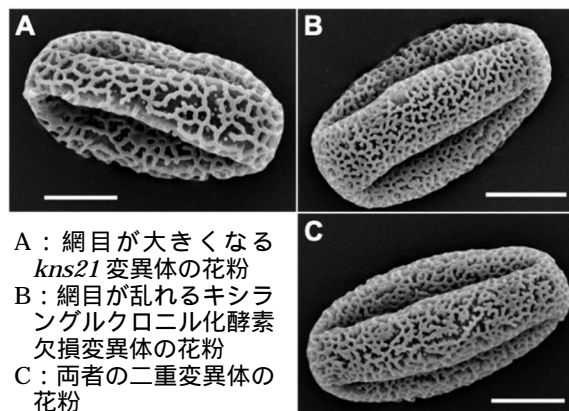
(2) キシランモジュールの形成におけるキシラン修飾の必要性

シロイヌナズナのキシラン合成酵素は三つのサブユニットからなる複合体であることが知られている。各サブユニットをコードする遺伝子の欠損変異体を一つずつ調べてみると、いずれの遺伝子の変異体においても同程度に網目の消失が見られ、どのサブユニットもキシラン合成酵素の活性に不可欠であることが確認できた。

次に、キシランの修飾酵素の必要性を検討した。キシランを構成するキシロースでは、遊離のヒドロキシ基の一部にアセチル基や4-O-メチルグルクロン酸が結合していることが知られている。このアセチル化を行う酵素、およびグルクロニル化を行う酵素の欠損変異株の花粉を観察したところ、いずれの場合もエキシンの構造に軽度の乱れが生じていた。しかし、両者の二重変異体を作出したところ、重篤な網目消失の表現型が現れた。アセチル化修飾とグルクロニル化修飾は構造的には全く異なるが、キシランに負電荷を付与する修飾という点では共通であり、両修飾はエキシン形成において相互補完的な機能を持つことが明らかになった。さらに、この二重変異体の表現型はキシラン主鎖の合成酵素の欠損変異よりも重篤であることから、キシランが負電荷を持つことはエキシンの網目形成に極めて重要な意味を持つことが明らかになった。

(3) エキシンの網目が大型化する突然変異体の解析とエキシンの網目サイズ決定機構

エキシンの網目が大きくなるシロイヌナズナの突然変異体 *kns21* の解析を行なった。遺伝子マッピングとゲノムシーケンスの結果から、この変異体の原因遺伝子は小胞体からゴルジ体にタンパク質を輸送するCOPII小胞の形成制御因子 SAR1 であると推定された。さらに、遺伝子導入による相補性試験やドミナントネガティブ型に改変した遺伝子の導入実験を行い、最終的に遺伝子を確定することができた。SAR1 はハウスキーピング遺伝子であるが、シロイヌナズナは SAR1 遺伝子を5個持つため、そのうちの1つが欠けても致死にはならない。GFPで可視化した KNS21 はエキシンの基本構造が作られる花粉四分子期にはタペート細胞で強く発現し、小胞体と思われる構造に蓄積していた。より大型の根の細胞では ER exit site に集積している様子が明瞭に観察できた。さらに、*kns21* で形成される大型の網目はキシランの合成能力に依存することも確かめられた。以上の結果より、KNS21 はキシランモジュールの大きさを制限する因子を花粉表面に供給することでエキシンの網目サイズを一定に保っているのだと結論した。



A : 網目が大きくなる *kns21* 変異体の花粉
B : 網目が乱れるキシラングルクロニル化酵素欠損変異体の花粉
C : 両者の二重変異体の花粉

(4) エキシンの網目が小型化する突然変異体の解析

エキシンの網目が小さくなるシロイヌナズナの突然変異体 *kns34* の解析を行なった。遺伝子マッピングとゲノムシーケンスの結果から、KNS34 は Ypt/Rab-GAP の一つであることがわかった。相補実験の結果から、この因子は小胞子の内部で機能すると推定された。

(5) プライムエキシンの形成を阻害する *nerd1* 突然変異体の解析

NERD1 はゴルジ体に局在する機能不明の膜タンパク質である。根の伸長や根毛の伸長を阻害する突然変異体の原因遺伝子として同定されたシロイヌナズナの遺伝子であるが、全身で発現し胚珠の数、受性能、花粉の発達にも関与する。*nerd1* の花粉ではエキシンが全く形成されない。その原因を調べるため、花粉四分子期と遊離小胞子初期の小胞子を樹脂包埋し、切片を作成して免疫染色を行なった。その結果、通常この時期の小胞子表面には大量に存在するはずのキシランやペクチンが全く検出できず、*nerd1* の小胞子はプライムエキシンを完全に消失していることが明らかになった。

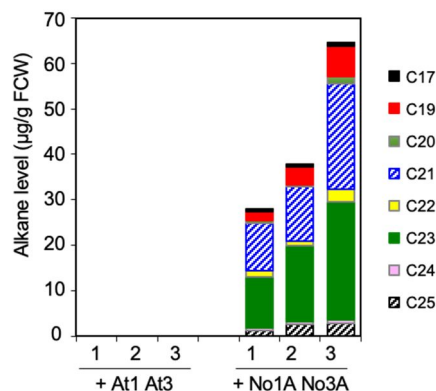
(6) イネやユリの小胞子表面に存在する多糖の検出

単子葉植物であるイネやユリは、同じ被子植物でもシロイヌナズナとは離れた系統である。単

子葉類は単系統であるとされるが、ユリがシロイヌナズナと同様の網目状エキシンを形成するのに対し、イネは平滑な2層からなるイネ科に特有のエキシンを形成する。免疫染色を行なってみると、ユリの小胞子ではシロイヌナズナの場合と同様のキシランやペクチン(低メチル化ホモガラクトソナン)がラクナの中に検出されるが、イネの場合は両方ともほとんどなく、一方シロイヌナズナの小胞子にはほとんどない高メチル化ホモガラクトソナンが二層のエキシンの間に検出された。キシランのモジュールは単子葉類と双子葉類が分かれる前から網目状エキシンの形成に関与しており、一方イネ科はそれとは異なる独自の進化を遂げたのかもしれない。

(7) バイオ燃料として利用可能な炭素鎖長のアルカンを合成する酵素の同定

エキシンはスポロポレニンと名付けられた脂肪酸およびポリケチド由来のポリマーであり、多糖ではない。エキシン形成において両者には排他的な相互作用が見られ、そのしくみには興味を持たれるが、わかっていることはほとんどない。この研究の過程で、スイレンの一種 *Nymphaea odorata* が一般的な植物よりも短いアルカンを花粉表面に蓄積することを見出し、それを合成する酵素 NoCER1 および NoCER3 に注目した。この酵素の遺伝子を単離し、アルカン合成能力を持たないタバコの培養細胞に遺伝子導入したところ、この細胞がアルカンを生産できるようになった。シロイヌナズナの酵素の遺伝子を導入した場合にはアルカン合成は起きなかった。石油代替燃料をバイオ生産する技術開発は進んでいるが、石油の主成分であるアルカンそのものを作る技術の開発は遅れており、その理由の一つは優れた能力を持つ酵素が少ないことである。スイレンの酵素は、一般的な細胞に導入するだけで燃料としても化学材料としても適した炭素鎖長のアルカンを合成できる優れた酵素であり、有用性は高い。本項目の研究は、結果的にエキシン形成のしくみとは結び付かなかったものの、有用な性質を持つ酵素を同定する成果につながった。



タバコ培養細胞を用いたアルカン生産。シロイヌナズナのアルカン合成酵素 (At1 At3) を導入した場合とスイレンの酵素 (No1A No3A) を導入した場合の生産量。グラフは生成したアルカンの炭素鎖長で色分けした。1,2,3 は独立に行なった3回の実験の結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hossain Md. Firose, Dutta Amit Kumar, Suzuki Takamasu, Higashiyama Tetsuya, Miyamoto Chiharu, Ishiguro Sumie, Maruta Takanori, Muto Yuki, Nishimura Kohji, Ishida Hideki, Aboulela Mostafa, Hachiya Takushi, Nakagawa Tsuyoshi	4. 巻 257
2. 論文標題 Targeted expression of bgl23-D, a dominant-negative allele of ATCSLD5, affects cytokinesis of guard mother cells and exine formation of pollen in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-023-04097-0	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 該当する

1. 著者名 Xu Dawei, Mondol Palash Chandra, Ishiguro Sumie, Shi Jianxin, Zhang Dabing, Liang Wanqi	4. 巻 1
2. 論文標題 NERD1 is required for primexine formation and plasma membrane undulation during microsporogenesis in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 aBIOTECH	6. 最初と最後の頁 205 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s42994-020-00022-1	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鍋田紗妃, 上木望路, 松岡耕汰, 中川強, 石黒澄衛
2. 発表標題 シロイヌナズナのCOP11被覆小胞形成因子KNS21の花粉エキシン形成における役割
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sumie Ishiguro
2. 発表標題 Contribution of xylan and arabinogalactan proteins to pollen exine development
3. 学会等名 The 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本真季, 山崎有紗, 吉成晃, 石黒澄衛, 高野順平
2. 発表標題 タバト細胞に発言するBOR1は花粉形成に重要である
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島久恵, 鈴木孝征, 石黒澄衛
2. 発表標題 スイレン由来アルカン合成酵素によるタバコ培養細胞BY-2でのアルカンの生産
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sumie Ishiguro, Masayuki Yasutomi, Toshiya Suzuki, Joan Onate Narciso, Kyoko Esaki, Wei Zeng, Monika S Doblin, Antony Bacic
2. 発表標題 Contribution of cell wall polysaccharides to the construction of the reticulate exine structure of pollen grains in Arabidopsis
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院生命農学研究科 生物化学研究室ウェブサイト https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~biochem/ 研究室ウェブサイト https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~biochem/ishiguro.html
--

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
研究協力者	鈴木 孝征 (Suzuki Takamasa) (50535797)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	
研究協力者	小島 久恵 (Kojima Hisae)	名古屋大学・全学技術センター・技師 (13901)	
研究協力者	近藤 真紀 (Kondo Maki)	基礎生物学研究所 (63904)	
研究協力者	亀井 保博 (Kamei Yasuhiro)	基礎生物学研究所・教授 (63904)	

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		
中国	上海交通大学		
オーストラリア	La Trobe University		