

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14729

研究課題名(和文)花粉管誘引リガンド-受容体シグナル伝達を制御する複合体ダイナミクスの解析

研究課題名(英文)Analysis of the receptor complex controlling pollen tube attractant signaling

研究代表者

武内 秀憲 (Takeuchi, Hidenori)

名古屋大学・高等研究院(WPI)・特任助教

研究者番号：10710254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物が生殖を行うためには、雄の花粉管が雌しべ内を伸長し、誘引物質を感知することが必要である。本研究は、花粉管の伸長および誘引を制御する受容体タンパク質に着目し、シグナル伝達に重要な細胞内のパートナー分子の同定と細胞外の誘引物質による調節機構の解明を目的とした。受容体と相互作用する分子の探索・解析により、花粉管の伸長・誘引に関わる複数セットの分子群を同定した。また、花粉管の伸長と誘引物質の感知のそれぞれを、複数の花粉管受容体が協調して制御する作動原理の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉管の伸長・誘引は、被子植物が同種同士で生殖行い、子孫を残すために必須の仕組みである。この過程の制御に関わる受容体および関連する分子を発見し、作動原理を解明したことで、植物の生殖を制御する技術の開発にも繋がるような、基礎的な知見の蓄積に貢献した。また、花粉管のように伸長する細胞は動植物を通じて存在するため、細胞の伸長制御の普遍性・特異性の理解にも寄与した。

研究成果の概要(英文)：Pollen tube growth and attractant sensing are essential for angiosperm reproduction. Here we studied how the pollen tube receptors regulate growth and attractant sensing through cytoplasmic partner molecules as well as external attractants. By investigating possible cytoplasmic interactors with the receptors, we identified multiple sets of molecules involved in pollen tube growth and attractant sensing. In addition, we showed how the multiple receptors control each of efficient growth and attractant sensing of the pollen tube in a cooperative manner.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：受容体 シグナル伝達 花粉管 誘引物質 極性成長 シロイヌナズナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被子植物において、花粉管 (先端成長する雄の配偶体細胞) が雌しべの中を伸長し、誘引物質により伸長方向が調節されることが、生殖の成功に必須である。花粉管の伸長と誘引 (伸長方向の調節) の現象は古くから知られていたが、それらの制御に関わる分子の実体の多くは不明であった。本研究代表者らは、モデル双子葉植物のシロイヌナズナを用いた研究により、花粉管誘引物質 AtLURE1 と花粉管側の受容体である PRK6 (Pollen-specific Receptor-like Kinase 6) を同定し、それらの相互作用が花粉管の誘引を引き起こすことを明らかにしてきた (Takeuchi and Higashiyama, *PLoS Biol.*, 2012; *Nature*, 2016; Zhang, Liu, Nagae et al., *Nat. Commun.*, 2017)。興味深いことに、PRK6 は花粉管の伸長に関わると提唱されてきた PRK ファミリーに属する受容体様キナーゼであり、PRK6 を含む複数の PRK 受容体を破壊した多重変異体は花粉管伸長に異常を示す。PRK6 と他の PRK 受容体が相互作用することも示唆されており、花粉管の伸長と誘引のそれぞれを複数の PRK 受容体が協調して制御すると考えられた。しかしながら、PRK6 が他の PRK 受容体と協調して機能するための仕組みや、AtLURE1 によって調節される際の分子ダイナミクスなど、PRK6 受容体複合体によるシグナル伝達の詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

- (1) PRK6 の細胞内シグナル伝達に関わる因子の探索・解析により、AtLURE1 シグナルを細胞内に伝達するための仕組み、それに関わる基本コンポーネントの同定を目指した。
- (2) PRK ファミリーの受容体に着目し、PRK6 との相互作用解析、局在や *prk* 多重変異体の解析、機能ドメインの解析により、PRK ファミリーの受容体による花粉管の伸長・誘引制御の包括的な理解を目指した。

3. 研究の方法

- (1) PRK6 の細胞内シグナル伝達に関わる因子の探索・解析

PRK 受容体の細胞内領域と相互作用することが知られていた低分子量 GTPase ROP およびその活性化因子 ROPGEF のそれぞれのファミリーに対し、花粉管で顕著に発現する遺伝子を全て破壊した株を作出し、花粉管の伸長および AtLURE1 応答に対する表現型を解析した。また、受容体様細胞質キナーゼ (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, RLCK) をコードする複数の遺伝子群にも着目し、変異体の作出・解析を行った。冗長的にはたらくと考えられる複数遺伝子に対しては CRISPR-Cas9 系を組み合わせて用いることで、効率的に多重変異体を作成した。

- (2) PRK ファミリー受容体による花粉管伸長・誘引の制御機構の理解

蛍光タンパク質融合の PRK (PRK1~8) をネイティブプロモーターで発現する株を作出し、PRK 受容体の局在解析を試みた。タバコの葉の細胞を用いた BiFC (二分子蛍光相補性) 解析および共免疫沈降実験により、PRK6-PRK 間の相互作用を解析した。複数の組み合わせの *prk* 多重変異体を作成し、花粉管の伸長および AtLURE1 応答に対する表現型を解析することで、花粉管の制御に重要な役割を果たす PRK 受容体のセットを調べた。また、PRK6 を含む多重変異体に変異型 PRK6 を導入する実験により、PRK6 の機能に重要なドメインを解析した。

4. 研究成果

- (1) PRK6 の細胞内シグナル伝達に関わる因子の探索・解析

- ① シロイヌナズナの花粉管で顕著に発現する五つの ROPGEF 遺伝子を破壊した五重変異体を作成し、*semi-in vivo* 花粉管伸長系を用いて花粉管の伸長を解析した結果、野生型と比べて五重変異体の花粉管伸長は大きく損なわれていた (図 1)。また、花粉管伸長培地に AtLURE1 を加えることで引き起こされる花粉管の蛇行を解析するウェーブアッセイにより、五重変異体は AtLURE1 に応答しないことが示された。ROPGEF によって活性化される低分子量 GTPase である ROP ファミリーのタンパク質についても、花粉管で発現する三つの ROP 遺伝子に着目し、三重変異体の作製を試みた。これまでに三重ホモ変異体は得られておらず、花粉管の ROP タンパク質は花粉管伸長に必須である可能性が示唆された。

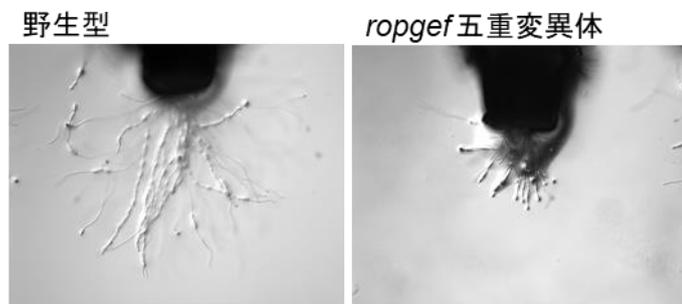


図1. *semi-in vivo*花粉管伸長アッセイにより、*ropgef*五重変異体の花粉管伸長異常が示された

ROP は細胞の先端成長において中心的な機能を果たす分子スイッチで、花粉管の効率的な先端成長にも重要な役割を果たすことが報告されてきた (Yang, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2008; Zhang and McCormick, *PNAS*, 2007; Chang et al., *Mol. Plant*, 2013)。これまでの研究では、恒常的活性化型やドミナントネガティブ型の ROP や ROPGEF を過剰発現や一過的発現系により発現させた実験の結果を元に機能が議論されてきたため、生理条件下における花粉管の ROP シグナル伝達の重要性は不明瞭であった。本研究により、花粉管 ROPGEF が花粉管の伸

長を正に制御することが明示されただけでなく、誘引物質 AtLURE1 の応答にも必要であることが初めて示された。花粉管の伸長シグナルは PRK 受容体-ROPGEFs-ROPs のモジュールにより制御されており、PRK6 が外部からの誘引シグナルを受容することで伸長シグナルが調節され、誘引すなわち伸長方向の変化が引き起こされるという仕組みが想定される。今後、本研究で確立した材料を用いることで、シグナル伝達の詳細を遺伝学的に解析するとともに、AtLURE1 によって変調される細胞内シグナル伝達のダイナミクスを解析する予定である。

- ② 膜貫通型の受容体様キナーゼの細胞内シグナル伝達には、細胞外領域をもたないタイプの受容体様キナーゼ RLCK が関わる例が多数報告されている (Liang and Zhou, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2018)。実際に、PRK6 も花粉管で発現する複数の RLCK と相互作用することが示唆されている (Liu et al., *Curr. Biol.*, 2013; Takeuchi and Higashiyama, *Nature*, 2016)。PRK 受容体の下流で花粉管の制御に関わる RLCK をさらに同定するため、花粉管で顕著に発現する RLCK 遺伝子に注目し、変異体の作出と semi-*in vivo* 花粉管伸長系で解析を行った。その結果、花粉管伸長の初期段階では通常と変わらず伸長するものの継続的に伸長できないという、これまでに報告のない異常を示す変異体を見出した (図 2)。今後、この RLCK と PRK 受容体や ROP シグナル伝達分子との関連を調べることで、PRK 受容体による花粉管伸長・誘引の制御機構の理解をさらに進めていく。

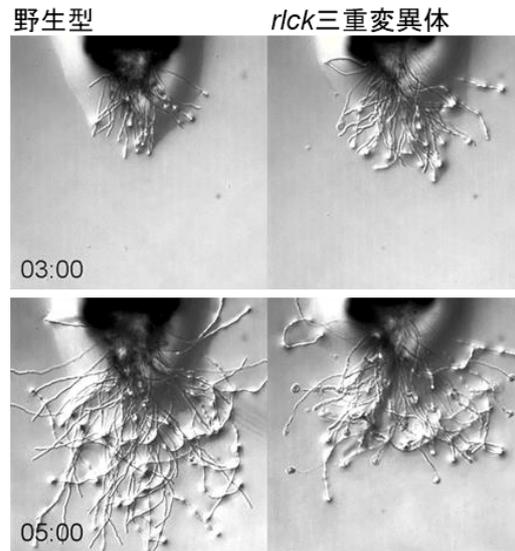


図2. 花粉管で発現するRLCK遺伝子の三重変異体の花粉管は、受粉後三時間(上段)では野生型と同様であったが、その後伸長停止するという表現型を示した。

- (2) PRK ファミリー受容体による花粉管伸長・誘引の制御機構の理解
- ① 遺伝子発現が見られない PRK7 と蛍光が検出できなかった PRK1 を除く 6 つの PRK の蛍光標識株において、花粉・花粉管の蛍光の局在を解析した。花粉管の伸長・形態に異常を示さない穏やかな発現量の株を用いて、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。伸長する花粉管において、PRK2、PRK5、PRK8 は花粉管全体の細胞膜に局在し、細胞質中の小胞に局在するものと考えられるシグナルも比較的多く観察された。一方で、PRK3、PRK4、PRK6 は細胞質よりも細胞膜に多く局在し、特に PRK3 と PRK6 では花粉管先端部に集中している様子が観察された。この観察結果から、伸長する花粉管においては、花粉管で発現する PRK 受容体のうち特に PRK3、PRK4、PRK6 が中心的な機能を担っていることが示唆された。
- ② タバコの葉の一過的発現系を用いた BiFC 解析により、PRK6 と PRK1~PRK8 の相互作用を調べた。その結果、PRK6 は PRK5 を除く 7 つの PRK と相互作用することが示唆された。さらに、共免疫沈降実験により、PRK6 と PRK3 または PRK6 との相互作用が確かめられた。PRK6-PRK6 間の相互作用の様式を調べるために、細胞外のロイシンリッチリピート (LRR) ドメインまたは細胞内のキナーゼドメインのそれぞれを欠失させた PRK6 を用いて BiFC 実験を行った。検出された BiFC シグナルの局在が少しずつ異なっていたものの、LRR ドメインとキナーゼドメインのいずれの組み合わせにおいてもシグナルは検出された。以上の結果より、PRK6 は他の多くの PRK 受容体と相互作用し得ることが確認され、細胞外 LRR ドメインやキナーゼドメインではなく、細胞膜貫通領域あるいはその周辺部を介して相互作用することが示唆された。
- ③ これまでの研究では、PRK3 と PRK6 に対する二重変異体やそれらを含む多重変異体のみで花粉管伸長の顕著な異常が見出されていた (Takeuchi and Higashiyama, *Nature*, 2016)。しかしながら上述のように、多数の PRK 受容体が花粉・花粉管で発現しているため、さらなる PRK 受容体の組み合わせが花粉管の機能に重要である可能性が想定された。そこで、花粉管の伸長に顕著な異常を示さない *prk1;2;4;5* 四重変異体に対して、PRK3 または PRK6 遺伝子を CRISPR-Cas9 系により追加で破壊し、*prk1;2;3;4;5* および *prk1;2;4;5;6* 五重変異体を作製し、花粉管の伸長を解析した。*prk1;2;4;5;6* 五重変異体は顕著な異常を示さなかった一方で、*prk1;2;3;4;5* 五重変異体は *prk3;6* 二重変異体と同程度の伸長異常を示した。
- ①~③の結果から、様々な組み合わせで相互作用する PRK 受容体は、様々な花粉管のステージや部位で協調してはたらくことで、花粉管伸長の効率や外部シグナルの受容を担っていると考えられる。局在と多重変異体の解析結果から、伸長する花粉管の先端部では、PRK3/6 と PRK3/4 がそれぞれ重要な機能を果たすことが示唆された。PRK6 が AtLURE1 を受容することで、この局在や相互作用が制御され、PRK 受容体による花粉管の伸長シグナルが変調されると考えられる。
- ④ 花粉管の伸長および AtLURE1 応答に異常を示す *prk* 多重変異体 (*prk6* 変異を含む) に対し、

細胞外の LRR ドメインや細胞内のキナーゼドメインを欠失させた PRK6 を導入し、表現型を解析することで PRK6 の機能に重要なドメインを調べた。花粉管伸長の解析により、PRK6 のキナーゼドメインはその機能に必須である一方で、LRR ドメインは必須ではないことが示された。さらに、LRR ドメインと膜貫通ドメインの間に AtLURE1 の結合部位は存在するが (Zhang, Liu, Nagae et al., *Nat. Commun.*, 2017)、LRR ドメインがなくても AtLURE1 結合部位を含む細胞外領域の約 50 アミノ酸だけで PRK6 は AtLURE1 応答に機能できるという興味深い結果が示された。LRR ドメインを欠失した PRK6 では、伸長および AtLURE1 応答の効率が低下している様子は見られたため、PRK6 の LRR ドメインはその機能に必須ではないものの、効率的な制御に重要なものかもしれない。今後は、PRK6 と相互作用する他の PRK 受容体にも着目することで、PRK6 の LRR ドメインの機能や AtLURE1 結合が引き起こす複合体のダイナミクスを調べていく。

本研究により、PRK6 が花粉管の伸長と誘引の両方を制御するためのパートナー分子候補と制御機構の一端が明らかとなった。一見シンプルな花粉管の伸長を支えるために多数の PRK 受容体が緻密な調節を行っていることも示された。被子植物の生殖に重要な機能を果たす花粉管は、細胞自律的な伸長の制御だけでなく AtLURE1 のような外部シグナルによって方向や効率が調節される必要もあるため、多数の受容体を用いていると考えられる。雌しべ組織では分泌性タンパク質が多数発現していることも知られており、PRK6 に対する AtLURE1 のように、他の PRK 受容体に作用するリガンドの存在も予想される。今後、それぞれの PRK 受容体に対するリガンドの同定、複数の PRK 受容体の機能分担の詳細、その分子ダイナミクスを調べることで、PRK 受容体複合体による花粉管制御の分子機構について理解を進める。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Motomura Kazuki, Arae Toshihiro, Araki-Uramoto Haruka, Suzuki Yuya, Takeuchi Hidenori, Suzuki Takamasa, Ichihashi Yasunori, Shibata Arisa, Shirasu Ken, Takeda Atsushi, Higashiyama Tetsuya, Chiba Yukako	4. 巻 61
2. 論文標題 AtNOT1 Is a Novel Regulator of Gene Expression during Pollen Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 712-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1093/pcp/pcz235	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuya Nagae, Hidenori Takeuchi, Ashutosh Srivastava, Florence Tama, Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Species recognition in pollen tube attraction
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井本美紀, 東山哲也, 武内秀憲
2. 発表標題 花粉管の伸長および誘引におけるPRK6受容体のシグナル伝達機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長江拓也, 武内秀憲, Ashutosh Srivastava, Florence Tama, 東山哲也
2. 発表標題 異種と同種を見分ける花粉管誘引における認証機構
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内秀憲, 井本美紀, 長江拓也, 東山哲也
2. 発表標題 先端をいく花粉管受容体による極性制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井本美紀, 東山哲也, 武内秀憲
2. 発表標題 PRKファミリー受容体による花粉管の伸長・誘引制御の分子機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
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
研究協力者	井本 美紀 (Imoto Miki)	名古屋大学 (13901)	