

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06706

研究課題名(和文)新規花粉管誘引因子の探索と花粉管誘引因子の機能的多様性の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel pollen tube guidance factors and analysis of functional diversity of 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物の種が維持されるためには、同種の配偶体を選別して受精することが重要である。本研究では、これまでにトレンニア・シロイヌナズナという2種の植物の花粉管誘引因子LUREの解析で得られた知見を基礎として、以下の成果が得られた。(1) トマトにおいて花粉管誘引やin vitro受精を達成する実験系を確立した。(2) トマトにおいて胚のう特異的に発現する遺伝子の機能を明らかにした。(3) トレンニア複数種由来の誘引因子の構造活性相関解析から、誘引活性を示すための構造の共通性、活性に種特異性をもたらすための構造の多様性について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により初めて、トマトにおいて培地上で花粉管が胚珠内へと誘引される系を作成することができた。これはナス科植物を用いて人工的に異種間交配などをするための基盤となると期待される。また、受精過程において発現する複数の遺伝子の機能を解析できたことにより、植物有性生殖について基礎的な知見が深まったと言える。

研究成果の概要(英文)：To maintain species, it is important for organisms to recognize gametophytes from same species for fertilization. In this research, I have investigated the following topics which are based on my previous research about pollen tube guidance in *Torenia* and *Arabidopsis*. (1) I have established in vitro pollen tube guidance assay system in tomato and Solanaceae species. (2) I have analyzed the function of female gametophyte-specific genes in tomato. (3) I have revealed functionally important (and not important) sequences in *Torenia* LURE proteins.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物有性生殖 花粉管ガイダンス 受精

1. 研究開始当初の背景

受精は同種間での交配を保証し、異種間での望まない交配を排除するシステムである。植物の精細胞は花粉管によって胚珠へと運ばれるが、その際に雌しべ組織から様々なシグナルを受容して伸長が制御されることが知られている。我々のこれまでの研究により単離された、胚珠助細胞由来の誘引因子 LUREs は、植物免疫に関わる Defensin というタンパク質のファミリーに属するという共通性はあるものの、植物種間で配列の類似性が極めて低い。実際に、LUREs が同種の花粉管を選択的に誘引することが、これまでの研究より示されている。

我々はトレニア TFLURE1 とシロイヌナズナ AtLURE1 の配列多様性に着目し、両タンパク質の配列を併せもつキメラタンパク質を多数作成して、どの領域が花粉管誘引の種特異性に重要かを検討した。その結果、TFLURE1 の特定の領域を AtLURE1 の配列に置き換えたキメラタンパク質がシロイヌナズナの花粉管を誘引することがわかった。さらに AtLURE1 の該当する領域をアラニンに置換したタンパク質は花粉管を誘引しなかった。このことは、わずか数アミノ酸の置換で花粉管誘引因子の性質を変化させることができるという、大変興味深い結果を示している。同時に、長距離にわたって花粉管を誘引する CALL1 タンパク質をトレニア胚珠から生化学的手法で単離した。CALL1 は LURE とは配列の類似性はまったくないものの、LURE と同様にシステイン残基で分子内架橋をして立体構造をとる分泌タンパク質であり、トレニアとシロイヌナズナとで配列の多様性が大きかった。これらの結果は、複数の多型に富んだタンパク質により、種に特異的な誘引シグナルが形成されることを示唆している。しかしながら、花粉管誘引因子の分子実体が明らかになっているのは、双子葉植物ではシロイヌナズナ属とトレニア属植物およびそれらの近縁種、単子葉植物ではトウモロコシのみであり、花粉管誘引を制御する因子の構造的共通性・多様性を理解するための基礎的知見はいまだに十分とはいえない。

花粉管の誘引は雌しべ内部でおこる現象であるため、直接の観察や操作が難しい。トレニア、シロイヌナズナでは花粉と胚珠とを培地上で共培養し受精する系が確立されているため、花粉管誘引の研究が進んでいる。トレニア、シロイヌナズナ属以外で研究が遅れている理由の 1 つは、適切な実験系がないことである。

2. 研究の目的

本研究をするにあたり、以下の 3 つの目的を定めた。

- (1) 重要な作物種において花粉管誘引と *in vitro* 受精を評価する実験系を確立する
- (2) 花粉管伸長を制御する誘引因子を同定する
- (3) 複数種由来の誘引因子の構造活性相関解析から、誘引活性を示すための構造の共通性、活性に種特異性をもたらすための構造の多様性について明らかにする

3. 研究の方法

(1) トマトでの花粉管誘引系と *in vitro* 受精系の確立

花粉管誘引の普遍性・多様性を明らかにするために、あらたな植物種を研究に用いる。まず、作物としても重要であり分子生物学的実験手法の確立しているトマトでの花粉管誘引アッセイ系を立ち上げる。我々は独自に開発したマイクロ流体デバイスを改変してジャガイモでの誘引アッセイ系を確立している (モントリオール大学・Matton 教授との共同研究)。その際に、シロイヌナズナやトレニア用の条件ではジャガイモの花粉管はうまく伸長せず、植物種ごとに培地や培養時間などの条件を詳細に検討することが重要であると学んだ。そこで、まず、トマトのモデル系統として広く用いられている MicroTom を用いて、花粉管と胚珠の共培養が可能な培養条件を検討する。適切な培養条件が決まれば、花粉管の胚珠への誘引や、*in vitro* 受精を達成できるか、検討する。

(2) トマトでの花粉管誘引因子の同定

トマトにおいても花粉管誘引因子は胚珠や胚のうから分泌されていると想定される。そこで、野生型植物の成熟胚珠、花粉管を誘引しない未成熟胚珠、および胚のうをもたない SlSes 変異体の胚珠から RNA を単離し、次世代シーケンサーにより発現している遺伝子を網羅的に解析する。とくに野生型植物の成熟胚珠のみで発現している遺伝子は有力な候補となる。発現遺伝子がコードしているタンパク質を予測し、LUREs や CALL1 と同様に進化速度の速い (種間で配列が異なる) 分泌タンパク質をコードする遺伝子を、誘引因子の候補として選ぶ。(1) で *in vitro* アッセイ系が確立されれば、それを用いて、候補タンパク質の花粉管誘引活性を調べる。同時に候補遺伝子のノックアウト株を作成し、受精効率や花粉管誘引率に変化が見られるか調べる。これらの実験を通じて、トマトにおける誘引因子の同定を目指す。

(3) 複数種由来の誘引因子の構造活性相関解析

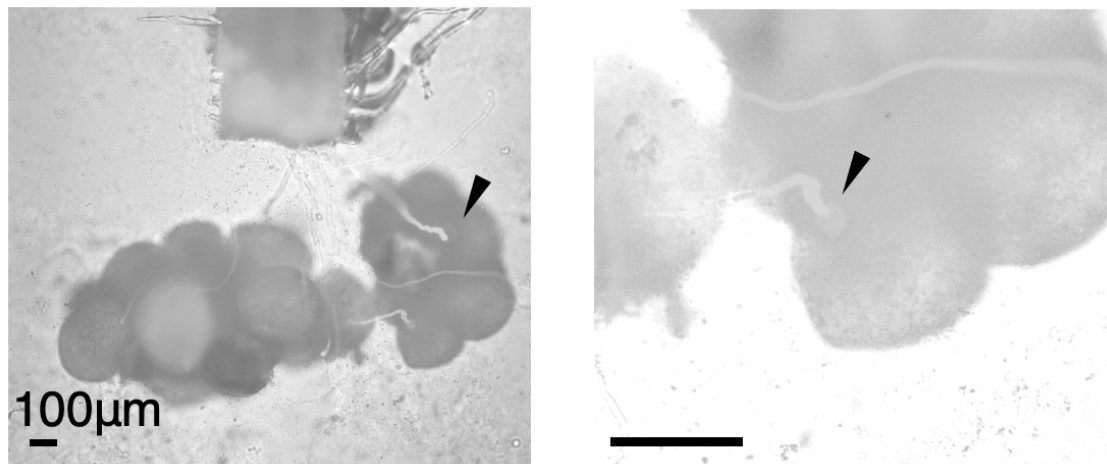
我々のこれまでの研究より、トレニア TflLURE1 の一部の領域をシロイヌナズナ AtLURE1 の配列で置き換えたキメラタンパク質は、シロイヌナズナの花粉管を誘引することができる。その領域を狭め、シロイヌナズナの花粉管誘引に必要な最小単位を明らかにする。また、シロイヌナズナ AtLURE1 にトレニア TflLURE1 の部分配列を導入したキメラタンパク質を複数種作成し、トレニア花粉管の誘引には TflLURE1 のどの配列が誘引に必要なかを検討し、すでに得られているシロイヌナズナ AtLURE1 の結果と比較する。また、これらキメラタンパク質を発現する遺伝子組換え植物を作成し、生体内でも機能することを確認する。(2)よりトマトで誘引因子が得られれば、その構造をトレニア・シロイヌナズナのそれと比較し、同様のキメラタンパク質を作成してそれぞれの種の花粉管に対して誘引活性を検討する。トレニア CALL1 のように長距離花粉管誘引に関わる因子が単離された場合には、これら長距離誘引因子に種特異性があるかを複数種の花粉管に対するアッセイで検討する。以上の解析を通じて、誘引活性を示すための構造の共通性、活性に種特異性をもたらすための構造の多様性について明らかにする。

4. 研究成果

(1) トマトでの花粉管誘引系と *in vitro* 受精系の確立

トマトを始めナス科植物はこれまでに液体培地で花粉を発芽させる実験がよくおこなわれてきた。当初はそれらの研究を参考にして培地を調整したが、花粉管が胚珠に到達するまでには長時間かかるため、十分に花粉管を伸長させることができなかつた。そこで、あらためて培地の組成の検討から開始することにした。

培地に加える糖や PEG の種類・濃度の調整にくわえ、いくつかの化合物を加えることで、花粉管と胚珠の状態を長時間にわたって保つことができる培地を調整することに成功した。この培地上で MicroTom の花粉管が胚珠へと誘引され、胚珠内に進入して破裂している様子を観察することができた(下図)。これより、トマトにおいても *in vitro* 受精系を確立することができた。



(2) トマトでの花粉管誘引因子の同定

トマト野生型 MicroTom の成熟胚珠および胚のうをもたない Sl ses 変異体の胚珠から RNA を単離し、次世代シーケンサーにより発現している遺伝子を網羅的に解析した。同時に、野生型胚珠の切片を作成し、レーザーマイクロダイセクションにより胚のうの助細胞・卵細胞領域のみを切り取り、次世代シーケンサーにより発現している遺伝子を網羅的に解析した。これらのトランスクリプトームを比較し、また、シロイヌナズナやトレニアの知見と併せて、システインリッチペプチドをコードする遺伝子を候補として複数選んだ。その中でも CRP#11 と名付けた遺伝子は、*in situ* mRNA hybridization やプロモーター-GFP 植物の解析により、胚のうの卵細胞・助細胞付近で発現していることが裏付けられた。CRP#11 を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトした植物は不稔となった(次ページの図)。これらの結果は、CRP#11 遺伝子が受精や胚発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、この解析方法を続けることで、他にも受精に関わる遺伝子を同定できると期待される。

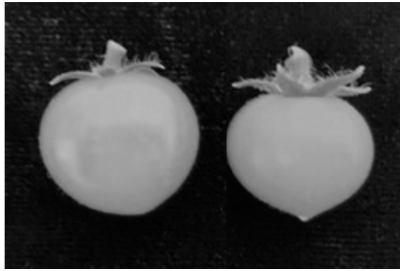
野生型(♀) #11 7-5(♀)

×

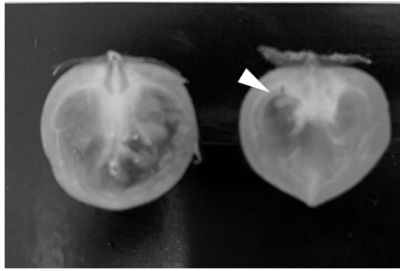
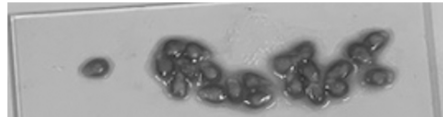
×

野生型(♂) 野生型(♂)

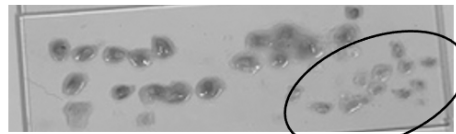
授粉後27日



野生型



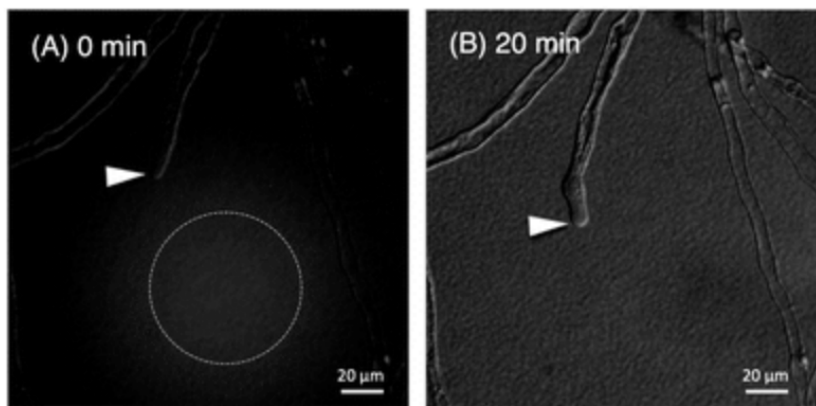
#11 7-5



(3) 複数種由来の誘引因子の構造活性相関解析

トレニア TflLURE1 とシロイヌナズナ AtLURE1 とのキメラタンパク質を複数作成し、シロイヌナズナ花粉管の誘引について重要な部位を決定した。その結果、TflLURE1 タンパク質の特定の部位をシロイヌナズナ AtLURE1 の数アミノ酸で置き換えるだけで、シロイヌナズナの花粉管を誘引できることがわかった。AtLURE1 のその領域をアラニンで置換したタンパク質は、シロイヌナズナの花粉管をまったく誘引できなかった。この結果は、全体の配列が大きく違っていても、一部の鍵となる部位が花粉管の誘引には重要であることを示している。

また、トレニアの LURE1 を化学合成で作成することを試みた。*T. fournieri* 由来の TflLURE1 と、*T. concolor* 由来の TcLURE1 を元にして様々なキメラタンパクを合成してアッセイした(下図)。その結果、誘引の種選択性にかかわる部位が同定された。その部位は上記のトレニア・シロイヌナズナ間でのアッセイで見つかった部位とも重なっていた。これらの結果より、花粉管誘引因子として LURE が機能するために重要な部位を同定することができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiyama Reiko, Sun Jianqiang, Hatakeyama Masaomi, Lischer Heidi E. L., Briskine Roman V., Hay Angela, Gan Xiangchao, Tsiantis Miltos, Kudoh Hiroshi, Kanaoka Masahiro M., Sese Jun, Shimizu Kentaro K., Shimizu Inatsugi Rie	4. 巻 229
2. 論文標題 Fine scale empirical data on niche divergence and homeolog expression patterns in an allopolyploid and its diploid progenitor species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 3587 ~ 3601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17101	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 Tsuchimatsu Takashi, Kakui Hiroyuki, Yamazaki Misako, Marona Cindy, Tsutsui Hiroki, Hedhly Afif, Meng Dazhe, Sato Yutaka, St?dler Thomas, Grossniklaus Ueli, Kanaoka Masahiro M., Lenhard Michael, Nordborg Magnus, Shimizu Kentaro K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Adaptive reduction of male gamete number in the selfing plant Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16679-7	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 Takemori Akane, Naiki Akiyo, Takakura Ko-Ichi, Kanaoka Masahiro M, Nishida Sachiko	4. 巻 123
2. 論文標題 Comparison of mechanisms of reproductive interference in Taraxacum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 1017 ~ 1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcz007	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 Kumarswamyreddy Nandarapu, Reddy Damodara N., Robkis D. Miklos, Kamiya Nao, Tsukamoto Ryoko, Kanaoka Masahiro M., Higashiyama Tetsuya, Oishi Shunsuke, Bode Jeffrey W.	4. 巻 1
2. 論文標題 Chemical synthesis of <i>Torenia</i> plant pollen tube attractant proteins by KAHA ligation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CB00039C	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Keisuke, Yamamoto Akane, Kanaoka Masahiro M., Naiki Akiyo, Takakura Ko-Ichi, Nishida Sachiko	4. 巻 135
2. 論文標題 Comparisons among populations and individuals to evaluate pollen?pistil interaction as a mechanism of reproductive interference in Taraxacum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01352-x	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masahiro Kanaoka, Kana Hisabayashi, Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Analysis of genes expressed in tomato female gametophytes
3. 学会等名 JSOL2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金岡雅浩
2. 発表標題 配偶体の機能や花粉管誘引に関わる遺伝子の単離と解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金岡雅浩、久林加奈、東山哲也
2. 発表標題 トマト胚珠で発現する遺伝子の解析と 花粉管誘引アッセイ系の開発
3. 学会等名 第84回植物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金岡雅浩
2. 発表標題 トマトにおける花粉管誘引アッセイ系の開発
3. 学会等名 第61回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物のin vitro受精システムの開発	発明者 金岡雅浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、08242019JP	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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