

機関番号： 82401  
 研究種目： 基盤研究(C)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20570047  
 研究課題名（和文）  
 花粉壁エキシンを構成するスポロポレニン生合成経路の解明  
 研究課題名（英文）  
 Functional analysis of sporopollenin biosynthetic pathway in pollen exine  
 研究代表者  
 伊藤 卓也（ITO TAKUYA）  
 独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・専任研究員  
 研究者番号： 80291912

## 研究成果の概要（和文）：

植物花粉壁の外層（エキシン）はスポロポレニンと呼ばれるポリマーから形成されているが、非酸化的分解に対して耐性のため、その化学構造は明らかになっていない。代表者はシロイヌナズナを用いてメタボローム解析と分子遺伝学的手法を組合せ、3-Ketoacyl-CoA 合成酵素、および BAHD アシル基転移酵素遺伝子のエキシン形成への関与を解析した。BAHD 遺伝子突然変異体が微細なエキシン形態変化を示したことから、エキシン形成への何らかの関与が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The outer layer of pollen wall, which is called exine, is made of “sporopollenin” polymer. But its chemical structure remains unknown because it is extremely resistant against nonoxidative degradation. The representative analyzed function of Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA synthases and a BAHD acyl transferase for their involvement in exine formation. A BAHD mutant showed a subtle phenotypic change in exine appearance. The BAHD gene, therefore, is suggested to be involved in exine formation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、花粉壁、エキシン、3-Ketoacyl-CoA 合成酵素、BAHD アシル基転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

雄性不稔は農業上有益な形質であるため、花粉発生メカニズムの研究は精力的に進められている。花粉発生において、花粉壁は外界環境から小胞子を守るために重要な役割を果たしており、不稔形質制御の重要なターゲットとして研究が精力的に進められている。

植物細胞壁のうち花粉壁は、インティン、エキシンと呼ばれる特徴的な構造を持つ。インティン（内層）は主としてセルロース・ペクチン等から成るのに対し、エキシン（外層）は構造未知のポリマーを主要素とする。スポロポレニンと命名されているこのポリマーは非酸化分解に対して耐性であることから、部分構造に分解してユニット構造を同定するという方法が無く、その化学構造は未だ明らかになっていない。

代表者はすでに、シロイヌナズナにおいて転写制御因子をコードする *MS1* 遺伝子の変異によりエキシン形成不全を生じること（図1）を明らかにし、*MS1* が制御する遺伝子としてフェノール酸（フェニルプロパノイド）・脂質合成系酵素遺伝子群を単離していた（文献1）。フェニルプロパノイド、脂質はスポロポレニンの構成要素として提唱されている物質である。

以上より代表者は、*MS1* 制御下の遺伝子群にスポロポレニン合成に関与する因子が含まれるという仮説を立て、メタボローム解析に加えて、分子遺伝学的解析でこれを立証しようと計画した。

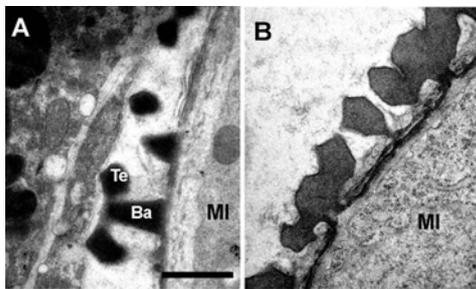


図1. 野生型と *ms1* 変異体のエキシン構造。

(A) 野生型花粉エキシンの断面。バキュラ、テクタムから成る T 字構造のエキシンが観察される。(B) *ms1* 花粉エキシンの断面。野生型エキシンで見られる構造が見られない。MI: 小胞子、Ba: バキュラ、Te: テクタム。

文献1. Ito, T. *et al.* (2007) *Arabidopsis* *MALE STERILITY1* encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. *Plant Cell* **19**, 3549-3562.

## 2. 研究の目的

本研究では、花粉壁エキシンの主要素であるスポロポレニンポリマーの生合成経路、特に、フェニルプロパノイド（フェノール酸）生合成経路、および脂肪酸合成経路解明に向けて、既に単離済みの生合成系酵素の候補遺伝子への T-DNA・トランスポゾン挿入シロイヌナズナ変異体の単離・表現型解析、メタボローム解析等により、これら候補遺伝子の生合成経路への関与の有無、並びに、スポロポレニンユニットの構造を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

分子遺伝学的解析では、シロイヌナズナの T-DNA・トランスポゾン挿入変異体コレクションから、フェニルプロパノイド生合成、脂質生合成・代謝系遺伝子への挿入変異体ラインを入手し花粉エキシン形態を観察した。各遺伝子にはパラログが多いことから、多重変異体の表現型解析も行った。解析を行った遺伝子、および T-DNA 挿入変異体は以下のとおり：

### 3-Ketoacyl-CoA合成酵素遺伝子

(AGI Code)	(Clone ID)
At1g71160	SALK_023400 JIC_SM_3_36110
At3g52160	FLAG_089611
At5g49070	SALK_089611 SALK_059313

### BAHDアシル基転移酵素遺伝子

(AGI Code)	(Clone ID)
At2g19070	SALK_055511

LC-MS/MS を用いたメタボローム解析により、*ms1* 突然変異体と野生型で差が見られる、フェノール酸骨格を持つ物質を検索した。各遺伝子挿入変異体についてもメタボローム解析を行った。

## 4. 研究成果

超長鎖脂肪酸合成の鍵酵素である 3-Ketoacyl-CoA 合成酵素 (KCS)、およびフェ

ニルプロパノイドの転移に関与することが示唆されるBAHDアシル基転移酵素に注目した。

MS1 転写因子の制御下にある *KCS* には 3 つの遺伝子パラログが存在し、それぞれの T-DNA 挿入変異体は葯発達表現型異常を示さなかった。次にこれらの三重変異体を作製したが葯発達表現型異常は観察されなかった。

LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行い、野生型と *ms1* 突然変異体の花序間で差がみられるピークを検索したところ、*ms1* ではヒドロキシシナモイルスペルミジン (図 2) が消失していた。また、MS1 下流に位置する BAHD アシル基転移酵素遺伝子の破壊変異体においてもヒドロキシシナモイルスペルミジンの消失が観察された (図 3)。この変異体は花粉致死形質を示さなかったが、微細なエキシンの異常は認められた。これら結果は、BAHD アシル基転移酵素はヒドロキシシナモン酸とスペルミジンとのアミド化酵素であること、また、この酵素がスポロポレン合成に関与することを示唆している。

*KCS* と BAHD アシル基転移酵素遺伝子の四重変異体を作製して表現型解析を行ったが、相乗的なエキシン形態異常は認められなかった。これら結果から、より多数の遺伝子欠損の影響で *ms1* 変異体のエキシン異常形質は引き起こされている、または、他にエキシン形成において決定的に重要な遺伝子が存在するという結論に至った。

LC-MS/MS を用いたメタボローム解析で、野生型花粉を極性有機溶媒で抽出した画分にヒドロキシシナモイルスペルミジンが大量に含まれていることから、ヒドロキシシナモイルスペルミジンはポーレンコート成分であることが判明した (図 4)。しかし、不溶性エキシン成分中のポリマー化したヒドロキシシナモイルスペルミジンを解析することは困難であり、熱分解 GC-MS 等の解析技術の確立が必要であり、今後の課題として残った。

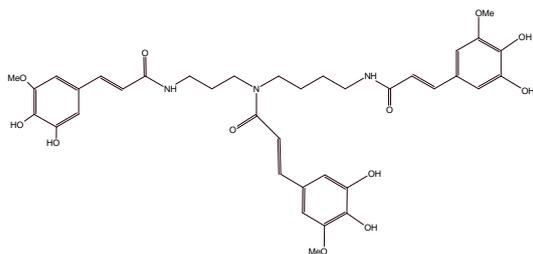


図 2. ヒドロキシシナモイルスペルミジンの一つ、Trihydroxyferuloyl spermidine の構造。

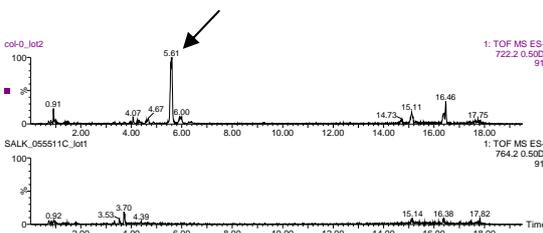


図 3. 野生型(上)と BAHD アシル基転移酵素遺伝子変異体(下)の花序を用いた LC-MS/MS 解析結果. 矢印は Trihydroxyferuloyl spermidine のピーク (m/z 722, 5.61 min.).

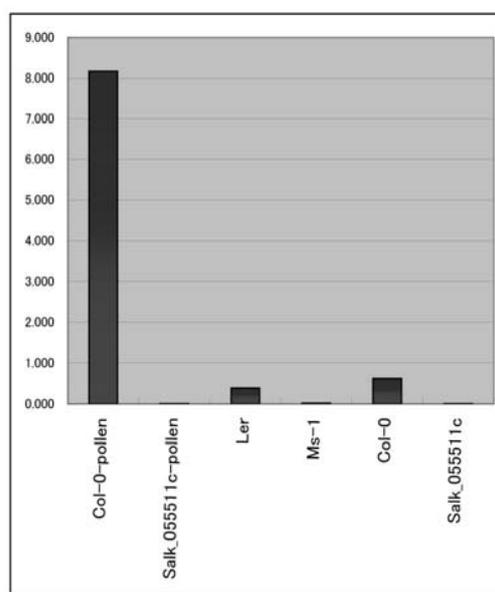


図 4. Trihydroxyferuloyl spermidine (m/z 722, 5.61 min) の含量の比較。  
 (Col-0-pollen) 野生型花粉 (Salk\_055511c-pollen のコントロール)  
 (Salk\_055511c-pollen) BAHD アシル基転移酵素遺伝子変異体の花粉  
 (Ler) 野生型花序 (Ms-1 のコントロール)  
 (Ms-1) *ms1* 変異体花序  
 (Col-0) 野生型花序 (Salk\_055511c のコントロール)  
 (Salk\_055511c) BAHD アシル基転移酵素遺伝子変異体の花序  
 含量は、単位湿重量あたりの相対値。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Yoneda, A., Ito, T., Higaki, T., Kutsuna, N.,

Saito, T., Ishimizu, T., Osada, H., Hasezawa, S., Matsui, M. and Demura, T.  
“Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules.”  
Plant Journal (2010) 64: 657-667  
(査読あり)

[学会発表] (計1件)

②伊藤卓也、松田史生、峠隆之、長田裕之、  
斎藤和季、篠崎一雄  
「花粉成熟に必須なシロイヌナズナMS1転写  
因子が制御するアシル基転移酵素遺伝子の  
機能解析」  
第50回日本植物生理学会年会  
2009年3月21-23日  
名古屋大学東山キャンパス

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 卓也 (ITO TAKUYA)  
独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー  
評価研究チーム・専任研究員  
80291912

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者