

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21417

研究課題名（和文）花粉細胞を仮死状態からリリースする分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism for releasing pollen cells from quiescent state

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：この研究は、花粉細胞が仮死状態から急速に液胞化し、高速で先端成長状態へと移行するメカニズムについて、植物のVPS13aという分子に着目して解析を行なった。VPS13aは小胞体ネットワークやLipid droplet（LD）といった細胞内オルガネラ間の接着とリリースの制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、VPS13aは分泌小胞を構成するタンパク質と共局在することが明らかとなり、VPS13aを欠損させると花粉管の分泌に影響が生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、植物のVPS13aの生化学的な機能が初めて明らかとなった。VPS13は真核生物において普遍的に保存されており、様々な細胞機能をもつことが報告されてきた。一方で、本研究ではVPS13aが初めてエキソサイトーシスに関わることを示しており、細胞分泌と花粉管成長との間を取り持つ鍵分子であることを明らかにした。VPS13は真核生物で保存されているうちで最も大きなタンパク質のひとつであり未知が多く、本研究の基礎細胞生物学的な価値が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the mechanism by which pollen cells rapidly transition from a quiescent state to a state of high-speed tip growth, with a focus on a molecule called VPS13a in plants. It was revealed that VPS13a plays an important role in the regulation of adhesion and release between intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum and lipid droplets (LD). In addition, it was found that VPS13a co-localizes with proteins that make up secretory vesicles, and that the absence of VPS13a affects secretion in pollen tubes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：花粉 休眠 発芽 脂質体 小胞体

1. 研究開始当初の背景

生物は rigid でエネルギーを消費しない休眠状態と、fluid でエネルギーを消費する成長状態を使い分け、多様な環境に適応している。これは個体や組織のスケールの話ではなく、単細胞レベルでも観察される性質である。例えば、植物の花粉細胞は雄性配偶子として極めて重要な役割を持つが、虫や風などの媒介者によって運ばれる過酷な状態を耐えるため水分が 20%以下に制限され一種の仮死状態にある。そして雌蕊に受粉したのちは受精へ向けた花粉管同士の競争が始まる(図 1)。仮死状態で受粉したのち数分で吸水が始まり、わずか 15 分後には急速に液胞化し発芽孔から花粉管の先端成長が始まる。しかし、仮死状態から、如何にして数分のうちに生物界で最も高速とも言われる先端成長状態へと移行できるのか？そこには通常の細胞では用いられないような物理化学的なメカニズムが利用されているのではないだろうか？

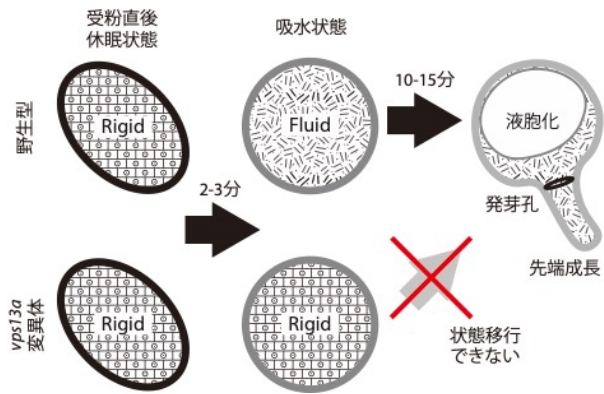


図 1 植物の花粉が休眠状態から先端成長へ移行するモデル

仮説: この問いに関してこれまでの研究経緯から以下の二つのメカニズムを仮説立てた。

1) まず、花粉細胞内は小胞体ネットワーク(ERN)が張り巡らされており、Lipid droplet(LD)、ミトコンドリアなどのオルガネラなどが連結されている(Yamamoto et al. 2003; 応募者ら未発表)。

したがって細胞を仮死状態から解き放つには、これらのオルガネラをテザリングされた状態からリリースする必要があり、ここに制御分子があると考えられる。

2) 次に、花粉に大量に存在する LD に着目した。LD は脂質から成る 300 nm 程度の生物普遍的な疎水構造である。LD は花粉発芽の過程で形成される大きな液胞膜の構成成分として消費されると予想される。しかしなぜ LD は休眠時の花粉内では細粒状態で貯蓄されているのだろうか？素早い発芽に液胞の膨張が必要であることを考えると、水分を含まない巨大な二重膜構造(=萎んだ液胞)を作って準備しておく方が合理的に思える。一方、LD はダイニンなどの分子モーターに乗って細胞内を積極的に移動する事が知られている(Welte 2009)。そこで、花粉は LD を物体として敢えて動かさず事で細胞内での分子の混ざり合いを促進し、休眠から発芽への高速な状態移行を可能にしているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、テザリングとリリースを司る分子を明らかにすることを目的とする。また、遺伝子改変によって LD のサイズを操作し、ライブイメージングを用いて LD の物性が持つ生理的な意義を明らかにする事を目指す。

3. 研究の方法

鍵となる分子は Vacuolar Protein Sorting 13(VPS13)である。VPS13 は真核生物に普遍的に存在し、平均 4,000 アミノ酸長の巨大タンパク質である。真核生物で保存されているタンパク質の中では最大の部類である(応募者ら、未発表)が、生化学的な機能の多くは未知である。VPS13 の N 末端にある疎水性領域は ERN と LD、ミトコンドリア、エンドソームなどをテザリングすると考えられている(Kumar et al. 2018)。

1) VPS13 のテザリング-リリースモデルの証明

そこで本研究では VPS13 がテザリングとリリースの両方を制御できる分子であることを示す。これまでの研究で、シロイヌナズナにおけるアイソフォーム a(VPS13a)を欠損した変異体では、LD が ERN からリリースされない事を見出してきた(図 2A)。一方、その他の VPS13 とは異なり、AtVPS13a は中央部に C2 と呼ばれるカルシウム依存的な膜結合ドメインを持つ。従って VPS13a は特殊な VPS13 であり、発芽花粉においてテザリング活性とカルシウム依存的なリリース活性を併せ持つのではないかと考えた(図 2B)。

この仮説を証明するため、本研究では VPS13a の機能的特異性を明らかにする事を目指す。CRISPR/Cas9 システムによる Base-editing や部位特異的相同性組換えを用いて VPS13a とその他

のアイソフォームとのキメラを作成し機能解析する。研究協力者の石綱史子博士との共同研究により、キメラ変異体における LD 構造の電子顕微鏡による解析を行う。また、蛍光タンパク質やタグを付加し、受粉時の細胞内局在解析や相互作用因子の探索を行う。

2) ライプイメージングと遺伝子操作による LD の細胞内機能の解析

生細胞における LD の可視化系はすでに確立しており、伸長する花粉管の中でそれを捉える事も可能である。一方、LD の形成に関わる Scipin タンパク質の変異体では LD が巨大化(Taurino et al. 2018)する事が報告されている。これらのラインを用い、LD のサイズと数が増減した状態で光褪色後蛍光回復法を用いて様々な細胞質構造体(微小管、ミトコンドリア、色素体等)の運動速度を捉える。LD の存在が細胞質の流動に与える影響を精査する。

4. 研究成果

1) LD のテザリング-リリースモデルの証明

本研究では花粉内で LD と小胞体が癒着した構造を取っていることに着目する。これまでの研究で、シロイヌナズナにおける VPS13 アイソフォーム a(VPS13a)を欠損した変異体では、花粉発芽時に LD が小胞体からリリースされない事を見出してきた。一方、その他の VPS13 とは異なり、AtVPS13a は中央部に C2 と呼ばれるカルシウム 依存的な膜結合ドメインを持ち、この C2 ドメインを削除することで花粉発芽能力が失われることをこれまでに明らかにした。そして、ノックイン系によって VPS13a のコーディング領域の 3'末端に Venus を挿入し、VPS13a を生体内で蛍光タグ標識した。シヨ糖密度勾配遠心と免疫沈降を用いて、VPS13a-Venus はエキソサイトーシスを仲介する Exocyst 複合体のサブユニットタンパク質 (SEC5、SEC8、SEC15 等) と花粉管の先端に共局在することがわかった。さらに、変異体の解析から、VPS13a は花粉管からのペプチドや、細胞壁成分カロース等の分泌 (図 3) に関わることが示唆された。

2) ライプイメージングと遺伝子操作による LD の細胞内機能の解析

生細胞における LD の可視化系はすでに確立しており、伸長する花粉管の中でそれを捉える事も可能である。一方、LD の形成に関わる Scipin タンパク質の変異体では LD が巨大化(Taurino et al. 2018)する事が報告されている。これまでの研究で scipin 変異体を作成し、それと同時に VPS13a を可視化する系統を作成した。そしてそれらの系統と光褪色後蛍光回復法をもちいて VPS13a の細胞内における挙動の調査を行なった。VPS13a は花粉管中の伸長先端領域に局在することが明らかとなった。また、VPS13a 機能を欠損した変異体では、分泌小胞のマーカである RAB4b が花粉管先端に正常に局在できなくなる事を見出した。

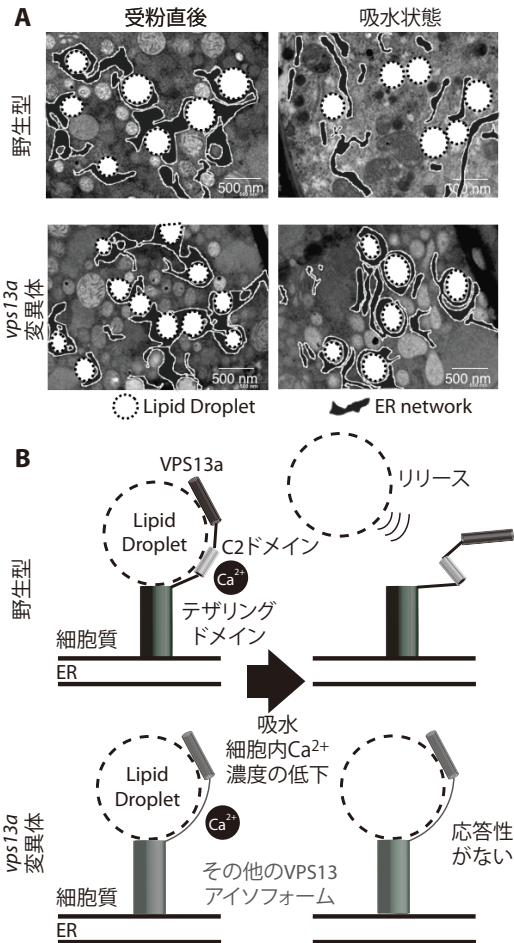


図 2 花粉発芽の分子モデル

シヨ糖密度勾配遠心と免疫沈降を用いて、VPS13a-Venus はエキソサイトーシスを仲介する Exocyst 複合体のサブユニットタンパク質 (SEC5、SEC8、SEC15 等) と花粉管の先端に共局在することがわかった。さらに、変異体の解析から、VPS13a は花粉管からのペプチドや、細胞壁成分カロース等の分泌 (図 3) に関わることが示唆された。

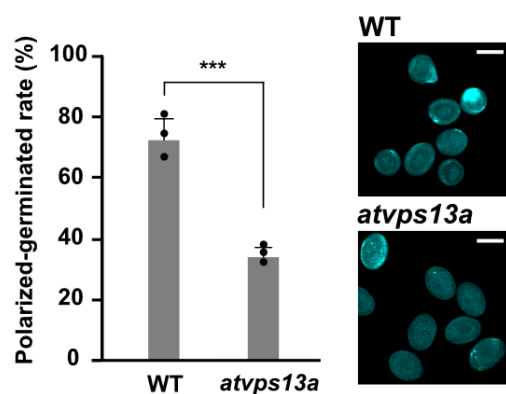


図 3 vps13 変異体はカロースを正常に分泌できない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 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 biorxiv	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Surachat Tangpranomkorn, 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 Surachat Tangpranomkorn, 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 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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------