

# 科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料 〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025  
課題番号：21H05030  
研究課題名：アブラナ科植物の種間不和合性と自家不和合性の統合的理解  
研究代表者氏名（ローマ字）：高山 誠司（TAKAYAMA Seiji）  
所属研究機関・部局・職：東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授  
研究者番号：70273836

## 研究の概要：

被子植物の多くは、雌ずいと雄ずいを内包した両性花により有性生殖を行う。雌ずいには昆虫などの媒介者により雑多な花粉が運ばれてくるが、植物は異種の花粉を排除する種間不和合性や、同種でも自己の排除する自家不和合性という仕組みを持ち、種とその遺伝的多様性を維持している。本研究ではこれらの分子基盤を明らかにし、有性生殖における巧妙な花粉選択の仕組みの統合的理解を目指す。

研究分野：農芸化学及びその関連分野

キーワード：植物、生殖、情報伝達、種間不和合性、自家不和合性

## 1．研究開始当初の背景

植物は交配相手として適切な花粉を選択する巧妙な仕組みを進化させている。アブラナ科植物では、雌ずい表層の乳頭細胞がその選択の中心的役割を果たし、多くの異種の花粉（種間不和合性）や、同種であっても自己の花粉（自家不和合性）は乳頭細胞上で発芽・伸長が抑えられ排除される（図1）。

アブラナ科植物の「自家不和合性」は、*S* 遺伝子座にコードされた花粉リガンド（SP11）と雌ずいの受容体キナーゼ（SRK）が *S* ハプロタイプ特異的に相互作用することで引き起こされることが明らかとなっている。また、「種間不和合性」は乳頭細胞上で異種花粉の積極的排除に関わる4回膜貫通型タンパク質 SPRII が鍵分子として関与することが示されてきた。さらに、同種花粉の能動的受入れに関わる「和合性（受諾）」経路の存在も示唆されてきている。



図1. アブラナ科植物の種間不和合性と自家不和合性の様子

## 2．研究の目的

種間不和合性、自家不和合性、同種和合性に関わる分子の実体がようやく明らかになりつつある一方で、各情報伝達経路の全体像はまだ見えてこない。また、これら3つの経路は、何らかの形で相互に干渉（クロストーク）していることが予測されるが、その実態は不明である。本研究では、上記3経路の分子機構解明をそれぞれ課題1～3として取り上げ、各経路の理解の深化を図ると共に、それらの相互作用を含めた花粉選択の統合俯瞰モデルを提唱することを最終目的とする。

## 3．研究の方法

本研究では課題1～3に対して、主に以下の方法で解明に挑む。【課題1】異種花粉排除の分子機構解明については、生化学的手法によるSPRII相互作用因子の探索や、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を利用した新規因子の探索などを行う。【課題2】自己花粉排除の分子機構解明については、マイクロ流路セルソーターを用いた一細胞スクリーニング系や、逆遺伝学的な解析によってシグナル伝達の制御因子を探索する。【課題3】同種花粉受諾の分子機構解明については、独自開発した花粉受諾検出システムを用いた和合性反応を誘起しない変異体花粉の探索と、和合性反応の誘起に必要な花粉のリン脂質分子の生物有機化学的同定などを行う。

## 4．これまでの成果

### 【課題1】異種花粉排除の分子機構解明

SPRIIに相互作用するタンパク質を探索したところ、クチクラ層の主成分であるクチンの合成に関わる酵素が見出された。そこで、クチン分解酵素を用いてクチクラ層を人工的に消失させたり、クチクラ層の変異体を用いたり、転写因子によってクチクラ層の組成を変化させる実験等により、クチクラ層が異種花粉に対する物理的障壁として機能することが見出された。

一方、これまでの研究でGWASによって見出されたSPRI2はzinc-fingerモチーフを持つ転写因子様の蛋白質である。本研究では、SPRI2が細胞壁の成分のキシランをアセチル化する酵素TBL40とTBL45の遺伝子領域に結合し、これらの遺伝子発現を正に制御することを見出した。SPRIIの発現亢進に間接的に

関わることも示され、SPR12が雌ずいにおける異種花粉排除システムを統括している可能性が見出された。また、本研究ではGWASを用いた更なる遺伝子探索を行った。近縁異種 *Erysimum allionii* の花粉を用いて新たに探索した結果、シロイヌナズナのある特定の系統の雌ずいにおいて花粉管が停止し排除されるとい現象を見出した。現在、この雌ずい側の責任分子を明らかにしており、機能の解析を進めている。

#### 【課題2】自己花粉排除の分子機構解明

本研究では、SRKを導入した細胞とマイクロ流路セルソーターを活用し、SRKシグナル伝達の下流分子を効率良くスクリーニングする系の確立を目指した。系を確立するためのセルソーターの選定を経て、現在スクリーニング系の精査、確立を進めている。

また、逆遺伝学的な解析により、SRKとSP11のシグナル伝達の下流にあると想定されるチャンネル・輸送体分子のスクリーニングを行った。この過程で、ある特定のチャンネル分子群を破壊したシロイヌナズナ変異体が、有意に自家不和合性を欠失した表現型を示すことを見出した。現在この結果の再現性を取りつつ、当該チャンネル分子の機能解析を行なっている。

#### 【課題3】同種花粉受諾の分子機構解明と排除経路干渉の実態解明

花粉受諾検出システムを用いた遺伝的なスクリーニングによって、花粉発芽に重要な分子 Vacuolar Protein Sorting 13a (VPS13a)を単離同定した。生化学的な解析から、VPS13a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し、機能相関性があることが示唆された。さらに、野生型の花粉では吸水したのちに脂質体が粗面小胞体からリリースされる現象が起こるが、*vps13a*変異体はこのような解離が起こらないことが明らかになった。

### 5. 今後の計画

#### 【課題1】異種花粉排除の分子機構解明

引き続き、SPR11の相互作用因子の探索を進め、SPR11複合体の構成と機能を生化学的に明らかにする。クチクラ層を含む細胞壁構造が種間不和合性における物理的障壁として機能していることを示唆するデータが蓄積しつつある。データを精査すると共に同種花粉がこの障壁を打破する仕組みの解明を進める。SPR12に関しては、下流の標的遺伝子の解析を進め、乳頭細胞内の種間不和合性因子の発現を統括している可能性を追求する。また、*E. allionii*花粉に対して種間不和合性をもたらす雌ずい側の新規分子に関しては、花粉側の相互作用分子の特定を進め、作用機作を明らかにする。

#### 【課題2】自己花粉排除の分子機構解明

自家不和合性への関与が示唆された新規チャンネル分子候補について解析を進める。本候補はファミリーを構成するため、多重変異体を作成し、シグナル伝達系への関与の確証を得る。特に、SP11-SRKのリン酸化経路の下流でこのチャンネルが制御される生化学的なメカニズムや、チャンネルのCa<sup>2+</sup>の透過能の解析を進める。さらに、一細胞スクリーニング系を駆使し、本シグナル伝達経路の全容解明を目指す。

#### 【課題3】同種花粉受諾の分子機構解明と排除経路干渉の実態解明

乳頭細胞に花粉受諾情報を送らない *vps13a* 変異体の解析を継続する。近年の生化学的な研究や構造生物学的知見から、VPS13はリン脂質輸送分子の一種であると推察されている。変異体花粉におけるリン脂質構成や輸送制御について解析を進め、同種受粉受諾における機能の解明を目指す。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Tangpranomkorn S, Igarashi M, Ishizuna F, Kato Y, Suzuki T, Fujii S\*, [Takayama S\\*](#). A land plant specific VPS13 mediates polarized vesicle trafficking in germinating pollen. *BioRxiv* doi: 10.1101/2022.11.01.514778, 2022. (査読無)
2. Fujii S\*, Yamamoto E, Tangpranomkorn S, Kimura Y, Miura H, Yamaguchi N, Niidome M, Shimosato-Asano H, Kato Y, Wada Y, Ito T, [Takayama S\\*](#). A phase-separated transcription factor regulates an interspecific barrier. *Research Square* doi: 10.21203/rs.3.rs-2015853/v1, 2022. (査読無)
3. Fukushima K, Kanomata T, Kon A, Masuko-Suzuki H, Ito K, Ogata S, Takada Y, Komatsubara Y, Nakamura T, Watanabe T, Koizumi S, Sanuki H, Park J-I, Niikura S, Suwabe K, Fujii S, Murase K, [Takayama S](#), Suzuki G, Watanabe M\*. Spatiogenetic characterization of S receptor kinase (SRK) alleles in naturalized populations of *Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* on Yakushima island. *Genes Genet. Syst.* 96:129-139, 2021. doi: doi.org/10.1266/ggs.20-00066 (査読有)
4. Takada Y, Mihara A, He Y, Xie H, Ozaki Y, Nishida H, Hong S, Lim Y-P, [Takayama S](#), Suzuki G, Watanabe M\*. Genetic diversity of genes controlling unilateral incompatibility in Japanese cultivars of Chinese cabbage. *Plants* 10:2467, 2021. doi: doi.org/10.3390/plants10112467 (査読有)

### 7. ホームページ等

東京大学大学院農学生命科学研究科生物有機化学研究室

<https://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seiyu>