

令和 7 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K14867

研究課題名（和文）アブラナ科自家不和合性の花粉吸水制御における細胞膜H⁺-ATPaseの機能解析研究課題名（英文）Analysis of plasma membrane H⁺-ATPase during pollination in Brassicaceae self-incompatibility

研究代表者

林 真妃（Hayashi, Maki）

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30942106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多くのアブラナ科植物が持つ自家不和合性の分子機構を明らかにするため、雌しべ乳頭細胞の浸透圧調節が不和合性を仲介するという仮説を立て、浸透圧調節に重要な細胞膜H⁺-ATPaseに着目してこの酵素の関与を調べた。その結果、アブラナ(*Brassica rapa*)柱頭のH⁺-ATPaseの活性が自家不和合性時に促進し、花粉への水移行を制御することが示された。また別のアブラナ科植物であるシロイヌナズナの柱頭においても遺伝学を用いて同様の結果が示されたことから、アブラナ科植物では乳頭細胞のH⁺-ATPaseを介した浸透圧調節が花粉への水移行を制御し、自家不和合性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブラナ科植物にはハクサイ、キャベツ、ブロッコリーなど多くの野菜が含まれ、我々の食糧として非常に重要である。これらの多くは自家不和合性を持ち、受粉時の雌しべ乳頭細胞から花粉への水移行を阻害することにより、自身の花粉による受精を拒絶する。アブラナ科植物の自家不和合性における、乳頭細胞と花粉の自他認識の分子メカニズムは明らかとなっているが、この乳頭細胞から花粉への水移行の制御メカニズムについての詳細は明らかとなっていない。本研究結果から、アブラナ科植物の乳頭細胞内に浸透圧制御が存在し、これが花粉へ水を渡すか否かを調節している可能性が示唆され、将来的にアブラナ科野菜の育種に貢献する知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the molecular mechanism of self-incompatibility in Brassicaceae plants, and we hypothesized that osmoregulation of the pistil papilla cells mediates self-incompatibility, and investigated the involvement of the plasma membrane H⁺-ATPase, which is an important enzyme for osmoregulation in plant cells. Our results showed that the H⁺-ATPase activity in the stigma of *Brassica rapa* was promoted during self-incompatibility and controlled water transport from papilla cells to pollen. Furthermore, similar results were shown using a genetic approach in the stigmas of *Arabidopsis thaliana*, another Brassicaceae plant, suggesting that in Brassicaceae plants, osmoregulation via H⁺-ATPase in the papilla cells controls water transport to the pollen and is involved in self-incompatibility.

研究分野：植物生理学

キーワード：花粉吸水 自家不和合性 細胞膜H⁺-ATPase アブラナ科植物

1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物の自家不和合性は *S* 複対立遺伝子の 1 遺伝子座によって制御されている。*S* 遺伝子がコードする花粉側因子 SP11 がリガンドとして、雌ずい側因子 SRK が受容体型キナーゼとして機能し、対立遺伝子特異的に結合して情報伝達することで自己認識がなされる。このような SP11 と SRK による自己・非自己認識が受粉時の雌ずい柱頭上で起こり、自家不和合性反応が誘導されることが明らかとなっている。自己花粉が受粉した場合は、雌ずい柱頭の乳頭細胞は自己と認識した後に花粉への水を渡さず、花粉吸水を阻害する。一方、非自己花粉が受粉した場合は、乳頭細胞は花粉に水を渡し、花粉吸水を促進する。ところが、このような乳頭細胞が持つ花粉への選択的な水移行の分子機構には不明な点が多い。

花粉は乾燥状態で受粉し、乳頭細胞から吸水して花粉管を発芽・伸長させる。花粉は自己・非自己にかかわらず、寒天培地上では発芽し、花粉管を伸長させることが知られている。そのため、柱頭上では、乳頭細胞が花粉の自己・非自己を識別後に、非自己花粉に対してだけ選択的に細胞外に水を出すことで花粉吸水を制御していると考えられた。ところが、非自己花粉を識別した乳頭細胞がどのように水を排出し、花粉に水を渡しているのか、その分子機構は受粉時の雌雄相互作用の観察の難しさから未解明である。伸長組織や気孔を構成する植物細胞は、細胞膜を介したイオン輸送を調節することで細胞内浸透圧を制御し、細胞内外への水の移行を駆動することが知られている。そのため申請者らは、乳頭細胞が花粉の自己・非自己に応じて細胞内浸透圧を調節し、花粉への水の移行を調節する可能性を考えた。

細胞膜 H^+ -ATPase は植物体全体でユビキタスに発現し、細胞外へ H^+ を排出することで細胞の膜電位と pH を調節して生命活動を支える重要な 1 次輸送体である。シロイヌナズナには細胞膜 H^+ -ATPase が 11 アイソフォーム存在し、その遺伝的冗長性の高さから遺伝学を用いた機能解析が難しい。これらの理由で、植物における H^+ -ATPase の生理機能には不明な点が多く、受粉時の雌雄相互作用における H^+ -ATPase の機能については報告されていない。一般的に、 H^+ -ATPase の活性が高まると植物細胞では 2 次輸送が駆動され、イオンなどの浸透調節物質を取り込み浸透圧が上昇することで、細胞への吸水が促進される。反対に H^+ -ATPase の活性が低下すると細胞内への浸透調節物質輸送も低下し、浸透圧が減少することで、細胞外へと水が流出する。これらの背景から申請者らは、受粉時に花粉が吸水するときは乳頭細胞の H^+ -ATPase 活性が低下して細胞外へと水が移行しやすくなり、逆に、自家不和合性により花粉吸水が阻害されるときは乳頭細胞の H^+ -ATPase 活性が高まり、細胞外へ水が移行しにくくなるのではないかと考えた。すなわち、乳頭細胞の H^+ -ATPase を介した浸透圧制御がアブラナの自家不和合性を制御する可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科植物の乳頭細胞から花粉への水の移行において乳頭細胞の細胞膜 H^+ -ATPase を介した浸透圧調節が関与する可能性を検証し、花粉吸水の分子機構を明らかにする。さらに、自家不和合性によりこの吸水機構が抑制されるか検証し、自家不和合性の分子機構を理解する。以上のことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

自家不和合性を示すアブラナ (*Brassica rapa*) の雌ずい柱頭を用いて Western 解析や

RT-qPCR 解析を進め、細胞膜 H⁺-ATPase のタンパク質の発現を確認し、さらに柱頭においてメインで働くアイソフォームを調べ特定した。また、H⁺-ATPase 活性を変化させる化合物として活性化剤のフシコクシンと阻害剤のバナジン酸を用い、それぞれ柱頭に処理したときの自家不和合性への影響を調べた。自家不和合性の評価は、雌ずいへの花粉管侵入と花粉吸水を観察・測定することで行った。さらに自家受粉と他家受粉時に柱頭の H⁺-ATPase の活性状態が変化しているかを、活性化に重要なリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いた Western 解析により調べた。

アブラナを用いて明らかにした H⁺-ATPase の受粉反応における機能を遺伝学的にも証明するため、同じくアブラナ科で自家和合性を示すシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の柱頭で主に発現する H⁺-ATPase アイソフォームの欠損もしくは恒常活性化変異株を用いて、花粉吸水、雌ずい内への花粉管侵入、花粉管伸長についても調べた。

4. 研究成果

1. アブラナ柱頭に発現する細胞膜 H⁺-ATPase アイソフォームの特定

アブラナ (*B. rapa*) のゲノムデータから H⁺-ATPase をコードする遺伝子のアノテーションを行い、H⁺-ATPase が 18 アイソフォーム存在することを明らかにした。このアイソフォームのうちいずれが柱頭に発現しているかを調べるため、RT-qPCR を行い、*Bra011172* と *Bra038835* の 2 遺伝子が主に発現しているアイソフォームであることを見出した。これらはシロイヌナズナ (*A. thaliana*) の柱頭で主に発現している H⁺-ATPase アイソフォーム *AtAHA1* と *AtAHA2* のオースログであった。

2. 自家不和合性反応における細胞膜 H⁺-ATPase 活性に影響を与える薬剤の効果

次に柱頭に発現している H⁺-ATPase が自家不和合性に参与しているのかを明らかにするため、*B. rapa* 柱頭に H⁺-ATPase の活性を変化させる化合物処理を行い、自家不和合性の観察を行った。柱頭に H⁺-ATPase 活性化剤であるフシコクシンを処理したところ、通常和合性を示すはずの他家受粉による花粉管の雌ずいへの侵入が阻害された。一方、H⁺-ATPase 阻害剤であるバナジン酸を処理したところ、自家不和合性反応が打破され、自家受粉による花粉管侵入が見られた。これらの結果から、柱頭の H⁺-ATPase 活性が阻害された場合は花粉管の侵入が誘導され、H⁺-ATPase 活性が促進された場合は花粉管の侵入が抑制されることが分かり、H⁺-ATPase の活性状態が自家不和合性に影響を及ぼすことが示された。

さらに、乳頭細胞の浸透圧変化が花粉への水の移行に影響を与えるか調べるため、H⁺-ATPase の活性を変化させる化合物を処理した柱頭上での花粉吸水を観察した。その結果、自家不和合性への影響と同様に、H⁺-ATPase 活性化剤処理により花粉吸水が抑制され、H⁺-ATPase 阻害剤処理により花粉吸水が促進された。

3. 自己および非自己花粉の受粉に対する柱頭の細胞膜 H⁺-ATPase 活性の変化

実際の自家受粉と他家受粉時に H⁺-ATPase の活性状態が変化するのかを明らかにするため、H⁺-ATPase の活性化に必要な C 末端 Thr 残基 (pen-Thr) のリン酸化を Western 解析により検出した。その結果、未受粉時の柱頭の H⁺-ATPase の活性状態と比較して、自家受粉では H⁺-ATPase のリン酸化レベルが上昇したが、他家受粉ではリン酸化レベルは変化しなかった。これらの結果から、アブラナの自家受粉では、柱頭の H⁺-ATPase が活性化することで

乳頭細胞の浸透圧が高まり、花粉への水移行が損なわれるために花粉吸水が阻害される可能性が示唆された。

3. アブラナ科植物の受粉反応における細胞膜 H⁺-ATPase の役割の遺伝学的検証

アブラナの実験により明らかになった H⁺-ATPase の受粉反応における機能を遺伝学的にも検証を行うため、シロイヌナズナの H⁺-ATPase 欠損変異体を用いた受粉反応の観察を行った。シロイヌナズナの柱頭で主に発現する *AtAHA1*, *AtAHA2*, *AtAHA11* の単一欠損変異株の雌ずいを用いて、野生株の花粉を受粉したときの応答について調べたが、いずれの欠損変異株においても野生株との差は観察されなかった。この結果については、3つのアイソフォームが重複して機能するため、単一欠損変異株では表現型が現れなかった可能性を考えている。

また、これまでに *AtAHA1* が恒常活性型になった変異株 *ost2-2D* が単離されているため、この変異株の雌ずいを用いて花粉吸水と花粉管伸長を野生株の雌ずいと比較した。その結果、花粉吸水と花粉管伸長の速度が低下していた。これらの結果から、シロイヌナズナは自家和合性を示すため、定常状態で雌ずいの H⁺-ATPase の活性をある程度抑え、花粉へと水が移行しやすい状態を維持している可能性が考えられた。

以上の結果を統合し、アブラナ科植物の乳頭細胞の細胞膜 H⁺-ATPase の活性化状態が乳頭細胞の浸透圧を変化させ、受粉した花粉への水の移行を調節している可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukushima K, Hayashi M, Watanabe M	4. 巻 38
2. 論文標題 The regulation of vacuole morphology in stigma papilla cells is involved in water transfer to pollen in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00497-025-00525-1	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 -

1. 著者名 Kuwayama Shogo, Hayashi Maki, Takahashi Koji, Hayashi Yuki, Fukatsu Kohei, Murakami Kei, Aihara Yusuke, Sato Ayato, Kinoshita Toshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 The Protein Kinase Inhibitor, Tyrphostin AG126, and Its Derivatives Suppress Phosphorylation of Plasma Membrane H ⁺ -ATPase and Light-Induced Stomatal Opening	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaf050	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林真妃, 福島和紀, 増子(鈴木)潤美, 井上晋一郎, 木下俊則, 高田美信, 渡辺正夫
2. 発表標題 柱頭のプロトンポンプがアブラナ科植物の受粉後過程に関与する
3. 学会等名 第66回 日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林真妃, 福島和紀, 増子(鈴木)潤美, 木下俊則, 井上晋一郎, 高山誠司, 高田美信, 渡辺正夫
2. 発表標題 雌しべ乳頭細胞の細胞膜H ⁺ -ATPase活性がアブラナ科の花粉吸水制御に関与する
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林真妃, 福島和紀, 増子(鈴木)潤美, 木下俊則, 井上晋一郎, 高山誠司, 高田美信, 渡辺正夫
2. 発表標題 アブラナ科の花粉吸水制御における雌しべ乳頭細胞の細胞膜H ⁺ -ATPaseの関与
3. 学会等名 日本育種学会 令和6年度春季大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林真妃, 渡辺正夫	4. 発行年 2024年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アブラナ科植物の受粉反応における雌しべプロトンポンプの役割の解明 アグリバイオ	

〔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
---------	---------