

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570082

研究課題名(和文)脂質が関与するポーレンコート形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Lipids are critical for formation of pollen coat.

研究代表者

永田 典子(Nagata, Noriko)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40311352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：花粉外壁に存在する脂質系粘着物質のポーレンコートは、葯タペータム内の脂質系オルガネラが内包する脂質成分の一部から作られると言われているが、その脂質成分の局在性・機能性やポーレンコート形成の仕組みの多くは不明であった。私は、透過電子顕微鏡レベルでシロイヌナズナ葯における脂質のオルガネラ局在マップを作成し、これら脂質系オルガネラの形成過程の詳細を明らかにした。さらにシロイヌナズナ脂質関連遺伝子欠損変異体の観察を行い、ポーレンコートを形成する機能性の脂質分子種を推定し、ポーレンコート形成過程における脂質の合成・蓄積・輸送・分解の一連のプロセスとそのしくみを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Male gametophyte in higher plants contains characteristic lipid-rich organelles. Much of the pollen coat material derives from two tapetal lipid-rich organelles: tapetosome and elaioplast. The analysis of lipid components of tapetosome, elaioplast, male gametophyte and pollen coat revealed that they package a defined series of lipid components. To understand the mechanism for formation of these lipid-rich organelles, I made an organelle-map using transmission electron microscopy during wild-type Arabidopsis pollen development. Furthermore, I analyzed the Arabidopsis mutants of lipid metabolism and described the role of lipids on the male gametophyte and tapetum development. It is becoming clear that the lipids are critical on the male gametophyte development by reverse-genetic strategy using Arabidopsis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：植物 シロイヌナズナ 花粉 葯 電子顕微鏡 脂質

1. 研究開始当初の背景

ポーレンコートとは、花粉外壁の隙間に存在する脂質系の粘着物質のことであり、花粉と柱頭の認識や自家不和合性をもたらす成分等を含む。ポーレンコート形成メカニズムを解明することは、農業・育種の観点においても大変有用である。

アブラナ科植物の葯最内層のタペータムには、タペトソームとエライオプラストという特殊に分化した脂質系オルガネラが存在し、これらはタペータム崩壊後にポーレンコートを形成すると言われている。タペトソームはトリアシルグリセロールやワックス成分に富んだオイルボディの一種であり、エライオプラストは種々の脂肪酸関連物質のほか特徴的なステロールを含む色素体である。しかし、ポーレンコートはこの両オルガネラの脂質成分の一部(ワックス、ステロール等)を含むのみであり、形成過程のどの段階で脂質の選別が行われるのか、どのようなしくみで花粉に運ばれ沈着するのか、個々の脂質の役割は何か、等の詳細についてはほとんど不明であった。このように、ポーレンコートの形成には、特殊に分化した脂質系オルガネラ群とその内包成分が重要な役割を果たすと考えられるが、これまでの研究は生化学的分析結果に基づくものがほとんどであり、*in vivo* における脂質成分の局在性や機能性の検討は立ち遅れていた。

抗体染色の可能なタンパク質等と異なり、脂質は特定の分子種のみを特定して局在性を示すことは困難である。しかし私は、微細構造学的解析手法の改良を進めた結果、固定法によって脂質系オルガネラの電子密度が異なることを見出し、電子顕微鏡レベルでの「脂質の染め分け」が可能であるとの感触を得た。例えば、化学固定法では同じ電子密度の高い顆粒として観察された2つの構造が、凍結固定法では片方の構造しか検出できない場合、2つの構造は異なる脂質成分から成るか異なる結合状態にあると予想される。一方で私は、シロイヌナズナ脂質関連遺伝子の変異体の収集と解析、及び透過型電子顕微鏡を用いた微細構造学的観察をおこなった。その結果、いくつかの変異体で、タペータムの脂質系オルガネラ異常やポーレンコート形成異常が生じることを見出してきた。以上のことから私は、様々な脂質関連遺伝子欠損変異体群を用いた網羅的な解析と、脂質を染め分ける手法とを組み合わせることで、タペータム脂質成分の局在性と機能性、及びポーレンコート形成機構が明らかになるのではな

いかとの着想を得た。

2. 研究の目的

花粉外壁に存在する脂質系粘着物質のポーレンコートは、葯タペータム内の脂質系オルガネラが内包する脂質成分の一部から作られると言われているが、その脂質成分の局在性・機能性やポーレンコート形成の仕組みは未だ不明のままである。私は、電子顕微鏡レベルで葯における脂質の局在マップを作成し、さらにシロイヌナズナ脂質関連遺伝子欠損変異体の網羅的な観察を行う。これにより、ポーレンコートを形成する機能性の脂質分子種を特定し、その脂質の局在性と役割を明らかにすると同時に、ポーレンコート形成過程における脂質選別や輸送沈着のしくみを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)透過電子顕微鏡を用いて野生型シロイヌナズナの葯における脂質の局在マップを作成する

ポーレンコート形成プロセスを明らかにするためには、葯タペータム内オルガネラの内包脂質成分をそれぞれ別のものとして識別することが求められる。固定液等を変えた試料の顕微鏡像を比較し、また外部添加した脂質の観察等により、これまで均一の顆粒としか認識できなかったオルガネラが異なる脂質構造から成ることを示す。この手法を用いて、タペータム及びポーレンコートにおける詳細な脂質の局在を示すマップを作成する。

(2)シロイヌナズナ脂質関連遺伝子欠損変異体の観察により、脂質の局在性と機能を明らかにする

ある代謝系の酵素が欠損した場合、その下流の機能代謝産物が欠損する。すなわち、その機能代謝産物の上流の酵素欠損であればどれも同じ表現型となるため、同じ代謝系の複数の欠損変異体を観察することにより、その欠損脂質分子種が何であるかを予想することができる。そこで、シロイヌナズナの脂質関連遺伝子欠損変異体の観察を行い、どの脂質分子種がタペータム及びポーレンコートのどの部分でどのような役割を果たしているかを推定する。

4. 研究成果

(1)透過電子顕微鏡を用いて野生型シロイヌナズナの葯における脂質の局在マップを作

成する

高等植物の雄性配偶体は、細胞組織の深部に存在し、またわずかな時間で刻々とオルガネラ形態が変化する動的な存在である。このことから、花粉形成に寄与する様々なオルガネラ分化の詳細な構造変化を示すことは、公的にも有用といえる。

葯の内部は何層にも渡って細胞が入り組んでいるため、深部までよい固定像を得ることはこれまで難しかった。物理的な加圧方式で化学固定を行ったところ、良好な透過電子顕微鏡 (TEM) 画像を得ることができた (図 1)。これにより、葯全体にわたる脂質系オルガネラの分化および細胞外分泌と花粉壁沈着のプロセス等の詳細が明らかとなった。

さらに、詳細な脂質オルガネラマップを作成するために、細胞や組織全体に渡る広域高解像度 TEM 像を取得する方法の開発も行った。これは、外部 PC から電顕をプログラム制御し電子ビーム方向と試料位置の制御を組み合わせることで、広域の電顕画像を全自動で撮影するものである。また、画像認識プログラムにより糊しる部分を張り合わせることで、大量の画像を全自動で結合することにも成功した。これにより、これまでに、最大 37,881 枚から成り、面積にして約 600 μm 四方の領域をカバーする 1 枚 TEM 画像を取得することができた。現在、この手法を用いて、花粉形成過程を通じた葯全体に渡る解像力の高いオルガネラマップの作成を進めている。

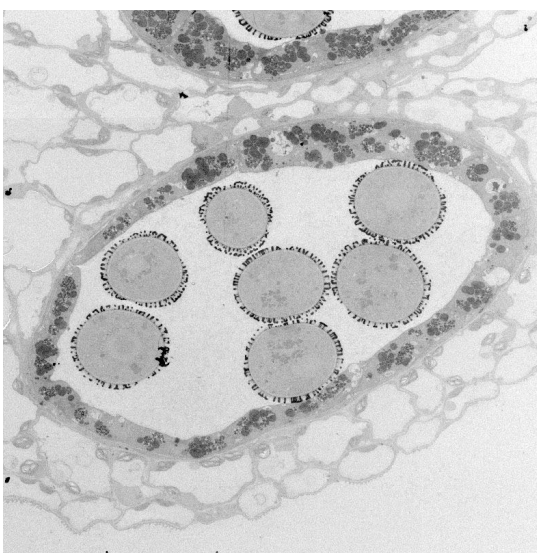


図 1. シロイヌナズナ葯の TEM 像

(2)シロイヌナズナ脂質関連遺伝子欠損変異体の観察により、脂質の局在性と機能を明らかにする

メバロン酸経路に関連した脂質関連突然変異体のうち、不稔形質を示すものを中心に TEM 観察を行った。具体的には、*hmg1* 変異体、*ipi1*, *ipi2* 二重変異体、*cer1* 変異体、*cas1* 変異体、花粉エキシン形成に異常を示す変異体等である。その結果、*hmg1*, *ipi1*, *ipi2* において、葯タペータムのエライオプラストにおける形態異常を確認することができた。

また、ステロールの脂質輸送に関連すると予想されるトランスポーターの欠損突然変異体の観察も行った。その結果、タペータムの膜上に脂質系物質の異常蓄積がみられ、さらに葯室内にも異常な脂質の凝集物がみられた。これは、脂質輸送に関する重要な知見を与えるものである。

さらに、オートファジー欠損と予想される突然変異体もラインナップに加え、脂質の分解に着目した解析を進めた。これまで、花粉やタペータム内では、オートファジーが行われているかどうかすらわかっていなかったが、私は今回、オートファジーが正常な花粉形成に何らかの機能を果たしているということを示唆するデータを得た。

以上のように、突然変異体の解析により、脂質の生合成・蓄積・輸送・分解という一連の流れを捉えることができたといえる。

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 13 件)

永田典子：被子植物の細胞質遺伝、Plant Morphology, 査読無, 23, 25-33 (2011)

S. Kumar, T. Yoshizumi, H. Hongo, A. Yoneda, H. Hara, H. Hamasaki, N. Takahashi, N. Nagata, H. Shimada, M. Matsui: Arabidopsis mitochondrial protein TIM50 affects hypocotyl cell elongation through intracellular ATP level. Plant Science, 査読有, 183, 212-217 (2012)

小澤あつみ、渡邊絵梨、永田典子、今井元：スペクトル観測によるクロロフィル成長過程の検討、電子情報通信学会誌, 査読有, vol.J95-C, no.10, 228-230 (2012)

明賀史純、永田典子：葉緑体タンパク質をコードする遺伝子変異体の表現型データベースの紹介、Perceptive Plants, 査読無, Vol.5, 19 (2013)

K. Shirasawa, K. Ishii, C. Kim, T. Ban, M. Suzuki, T. Ito, T. Muranaka, M. Kobayashi, N. Nagata, S. Isobe, S. Tabata: Development of Capsicum EST-SSR markers for species

identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence. *Molecular Breeding*, 査読有, 31, 101-110 (2013)

F. Myouga, K. Akiyama, Y. Tomonaga, A. Kato, Y. Sato, M. Kobayashi, N. Nagata, T. Sakurai, K. Shinozaki: The Chloroplast Function Database II: A comprehensive collection of homozygous mutants and their phenotypic/genotypic traits for nuclear-encoded chloroplast proteins. *Plant Cell Physiology*, 査読有, 54(2), e2, 1-10 (2013)

T. Nobusawa, Y. Okushima, N. Nagata, M. Kojima, H. Sakakibara, M. Umeda: Synthesis of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Epidermis Controls Plant Organ Growth by Restricting Cell Proliferation. *PLOS Biology*, 査読有, 11, 4, e1001531 (2013)

T. Nobusawa, Y. Okushima, N. Nagata, M. Kojima, H. Sakakibara, M. Umeda: Restriction of cell proliferation in internal tissues via the synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis. *Plant Signaling Behavior*, 査読有, 8, 8, Addendum DOI: 10.4161/psb.25232 (2013)

渡邊絵梨、清水麻里、小澤あつみ、永田典子、今井元：シロイヌナズナでのクロロフィル形成と環境条件との関係, 査読無、日本女子大学紀要理学部 第22号、p13-17 (2014)

Z. Duan, A. Homma, M. Kobayashi, N. Nagata, Y. Kaneko, Y. Fujiki, I. Nishida: Photoassimilation, assimilate translocation and plasmodesmal biogenesis in the source leaves of *Arabidopsis thaliana* grown under an increased atmospheric CO₂ concentration. *Plant Cell Physiology*, 査読有, 55(2): 358-369, doi:10.1093/pcp/pcu004 (2014)

T. Kurusu, T. Koyano, S. Hanamata, T. Kubo, Y. Noguchi, C. Yagi, N. Nagata, T. Yamamoto, T. Ohnishi, Y. Okazaki, N. Kitahata, D. Ando, M. Ishikawa, S. Wada, A. Miyao, H. Hirochika, H. Shimada, A. Makino, K. Saito, H. Ishida, T. Kinoshita, N. Kurata, K. Kuchitsu: OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*, 査読有, 10(5): 1-11 (2014) <http://dx.doi.org/10.4161/auto.28279>

豊岡公德、佐藤繭子、朽名夏磨、永田典子：高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用, *Plant Morphology*, 査読無, in press

R. Tanoue, M. Kobayashi, K. Katayama, N. Nagata, H. Wada: Phosphatidylglycerol biosynthesis is required for the development of embryos and normal membrane structures of chloroplasts and mitochondria in *Arabidopsis*. *FEBS letter*, 査読有 (2014) in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.010>

〔学会発表〕(計60件)

永田典子：TEM画像、600枚つなげてみました。植物電子顕微鏡若手ワークショップ2011 2011年11月21日(横浜, 理化学研究所)

豊岡公德、若崎真由美、吉田拓広、朽名夏磨、桧垣匠、永田典子、櫻井哲也、松岡健、持田恵一、佐藤繭子：生体顕微マルチスケーリングマッピング：小胞クラスターの分布と超微形態。第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16-18日(京都, 京都産業大学)

Toyooka K, Sato M, Kutsuna N, Higaki T, Nagata N, Mochida K, Matsuoka K, Shinozaki K: Electron microscopy atlas: ultrastructure and distribution of vesicle cluster. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing 2012. 3. 19-21(京都, 東大寺総合文化センター)

豊岡公德、若崎真由美、朽名夏磨、桧垣匠、永田典子、松岡健、持田恵一、佐藤繭子：生体顕微マルチスケーリングマッピングシステム：小胞クラスターの分布と構造。日本顕微鏡学会第67回学術講演会 2012年5月14日-16日(5/15)(つくば, つくば国際会議場)

澤木史江、小林恵、佐藤繭子、朽名夏磨、桧垣匠、馳澤盛一郎、豊岡公德、永田典子：透過電子顕微鏡における広域高解像度画像取得法の開発とその応用。日本植物学会第76回大会 2012年9月15日-17日(兵庫, 兵庫県立大学)

澤木史江、小林恵、佐藤繭子、朽名夏磨、桧垣匠、馳澤盛一郎、豊岡公德、永田典子：広域透過電子顕微鏡画像取得法の開発とその応用。第37回日本顕微鏡学会関東支部講演会 2013年3月6日(東京, 東大)

明賀史純、秋山顕治、朝長優美、加藤綾、佐藤由佳、小林恵、永田典子、櫻井哲也、篠崎一雄：Chloroplast Function Database II は核コード葉緑体蛋白質変異体の網羅的収集データと変異体の表現型データとを提供する。第54回日本植物生理学会年会 2013年3月21日-23日(岡山大, 岡山)

佐藤繭子、朽名夏磨、澤木史江、若崎真由美、桧垣匠、吉田拓弘、櫻井哲也、馳

澤盛一郎、持田恵一、永田典子、豊岡公德：電顕アトラス：高圧凍結技法を取り入れた広域電顕像撮影システムの開発．第54回日本植物生理学会年会 2013年3月21日-23日（岡山大，岡山）

加藤綾、明賀史純、秋山顕治、佐藤由佳、小林恵、櫻井哲也、篠崎一雄、永田典子：シロイヌナズナ葉緑体突然変異体のデータベース構築に向けた網羅的な透過電子顕微鏡解析．日本顕微鏡学会第69回学術講演会 2013年5月20日-22日（大阪，ホテル阪急エキスポパーク）

佐藤繭子、後藤友美、若崎真由美、朽名夏磨、澤木史江、永田典子、松岡健、豊岡公德：タバコ根端分裂組織における液胞膜タンパク質 V-PPase の分布と液胞形成．日本顕微鏡学会第69回学術講演会 2013年5月20日-22日（大阪，ホテル阪急エキスポパーク）

加藤綾、明賀史純、秋山顕治、小林恵、櫻井哲也、篠崎一雄、永田典子：葉緑体突然変異体の透過電子顕微鏡画像のデータベース構築．日本植物学会第77回大会 2013年9月13日-15日（北海道，北大）

澤木史江、小林恵、佐藤繭子、朽名夏磨、桧垣匠、馳澤盛一郎、豊岡公德、永田典子：広域 TEM 画像取得法の開発と茎頂オルガネラ地図作成への応用．日本植物学会第77回大会 2013年9月13日-15日（北海道，北大）

桧垣匠、加藤綾、明賀史純、朽名夏磨、馳澤盛一郎、永田典子：透過型電子顕微鏡画像に基づく葉緑体微細構造異常の自動認識．日本顕微鏡学会関東支部第38回講演会 2014年3月8日（日本女子大，東京）

豊岡公德、佐藤繭子、朽名夏磨、若崎真由美、澤木史江、桧垣匠、馳澤盛一郎、永田典子、松岡健：透過電顕像広域自動撮影システムの開発と植物組織への応用．第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日-20日（富山大，富山）

佐藤繭子、朽名夏磨、澤木史江、若崎真由美、橋本恵、桧垣匠、馳澤盛一郎、永田典子、豊岡公德：透過電顕像広域自動撮影システムの開発と植物組織への応用．第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日-20日（富山大，富山）

〔図書〕（計1件）

Nagata N: The selective increase or decrease of organelle DNAs in young generative cells controls cytoplasmic inheritance in higher plants. "Atlas of Plant Cell Structure" Springer, (2014) in press

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 典子 (NAGATA NORIKO)
日本女子大学・理学部・准教授
研究者番号：40311352

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし