

様 式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 23 年度）

1. 機関番号 

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成 23 年度～平成 25 年度
5. 課題番号 

2	3	5	7	0	0	5	6
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題 アブラナ科植物の和合受粉過程を誘導するシグナルとその情報伝達系の解析
7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 1 6 0 1 3 0	イワノ メグミ 岩野 恵	バイオサイエンス研究科	助教

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

## 9. 研究実績の概要

被子植物には、雌ずいに運ばれてくる様々な花粉の中から適切な交配相手を選択する機構を発達させている。アブラナ科植物では、雌ずい先端の乳頭細胞に異種の花粉が受粉した場合には、花粉の吸水・発芽が阻害され、受精が成立しない（種間不和合性）。また、同種でも自家花粉が受粉した場合にも、花粉の吸水・発芽が阻害され、受精が成立しない（自家不和合性）。これに対し、同種他家（和合）の花粉が受粉した場合には、花粉は吸水・発芽し、花粉管は乳頭細胞に侵入し、雌ずいを伸長、胚珠に到達して受精に至る。申請者はこれまでに、アブラナ科植物の花粉が、同種の雌ずいに対してその花粉の受入に必要な一連の生理反応を誘導する何らかの因子（「和合シグナル」と呼ぶ）を保持している可能性を見いだしてきた。この「和合シグナル」は、種間不和合性の機構を解明する上で鍵を握ると予測されるが、その実体については全く未解明である。本研究では、「和合シグナル」の実体を解明すること、そのシグナルにより乳頭細胞内に誘起される情報伝達系を解明することを目的として、生化学的、分子生物学的、遺伝学的解析を計画している。平成 23 年度は、1) 「和合シグナル」アッセイ系の構築による性状解析と、2) マイクロダイセクション・次世代シーケンサーによる「和合シグナル」候補遺伝子の同定を行なった。その結果、性状解析からは、和合シグナル分子が蛋白性分子であることと、タベート組織では CRP (cysteine-rich protein) 群が非常に高い発現を示すことが示唆された。従って、本研究でえられた新規 CRP 群中に和合シグナル分子が含まれていることが期待される。今後、これら候補遺伝子群の機能解析と、和合シグナルにより乳頭細胞内で誘起される情報伝達系の解明を進める予定である。

## 10. キーワード

(1) アブラナ科植物	(2) 和合受粉	(3) 和合シグナル	(4) マイクロダイセクション
(5)	(6)	(7)	(8)

## 11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

1) 和合シグナルアッセイ系による性状解析については、これまでに、カルシウム親和性蛍光指示薬カルシウムグリーンを用いたアッセイ法を用い、*B. rapa*花粉のシクロヘキササン抽出物中に乳頭細胞からの水・Caを排出する活性物質(和合シグナル物質)が含まれることを見いだしてきた。本年度は、この抽出画分を更にクロロホルム・メタノール処理により、脂溶性と水溶性とに分画し、活性判定を行った。その結果、脂溶性・水溶性共に活性が認められず、少なくとも和合シグナル分子は脂溶性物質ではないことが明らかになった。しかし、この抽出法では殆どの蛋白質が変性してしまっている為、蛋白質物質であるか否かは判断できなかった。そこで、花粉を水で抽出した場合にもシクロヘキササン抽出物と同様な活性が認められたため、水抽出物をゲル濾過により分離分画し、アッセイに供した。これまでに蛋白質の溶出画分で活性が認められたことから、和合シグナル分子は蛋白質分子であることが示唆された。

2) マイクロダイセクション・次世代シーケンサーによる和合シグナル候補遺伝子の網羅的解析については、*B. rapa*薬組織のパラフィン切片より、マイクロダイセクションによりタペート細胞と花粉小胞子とを回収し、次世代シーケンサー(FLX455, Roche)により両組織での遺伝子発現プロファイルを作成した。解析の結果、両組織で発現量の高い上位200contigには、CRP(cysteine-rich protein)が10%も含まれていることが明らかとなった。CRP群には、自家不和合性因子SP11を始め、受粉から受精に至る過程において花粉の選抜に関わる因子が含まれており、今回得られた新規CRP群中に和合シグナル分子が含まれていることが期待された。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

以下の4つの項目について、研究を進めていく予定である。

1) 引き続き、和合シグナルアッセイ系による性状解析を進める。和合シグナル分子の単離・同定を目指し、現在活性が認められるゲル濾過分画について、更にイオン交換や逆相クロマトグラフィーによる分離・精製を進める。また活性分画については、プロテアーゼなどの分解酵素を用いた性状解析も行っていく。

2) 「和合シグナル」の遺伝学的、生化学的評価を行なう。昨年度同定した*B. rapa*タペート細胞及び花粉小胞子において高発現であったCRP群に着目し解析を進めていく。申請者は*B. rapa*の柱頭上では*A. thaliana*の花粉は吸水・発芽しないこと(種間不和合性)を確認している。このことは、*A. thaliana*の花粉表層物質中には*B. rapa*型の和合シグナル物質が存在しないことを示唆している。そこで、今回得られた*B. rapa*のCRP群について*A. thaliana*のものと同様にアミノ酸配列の比較解析を行う。特に*B. rapa*と*A. thaliana*間でより分子進化の早いICRPは、有力な候補遺伝子と位置づけ*A. thaliana*花粉に*B. rapa*のCRPを発現させることで、種間不和合性が打破されるかどうかを解析する予定である。

3) 「和合シグナル」下流情報伝達系の生理学的解析を行なう。和合受粉時には、花粉の吸水発芽を進めるために、花粉から乳頭細胞へ水やイオンが供給されることが期待される。またそれに伴って、乳頭細胞オルガネラが大きく変動することが期待される。そこで、*A. thaliana*の乳頭細胞のオルガネラ(小胞体、ゴルジ体など)を蛍光標識したラインを作成する。またSEM/EDXシステムにより、受粉時の元素変動を調べる予定である。

(次年度の研究費の使用計画)

【備品費】本研究の遂行に必要なシーケンサーや液体クロマトグラフィー、顕微鏡などについては、学外・学内の共同利用施設で利用可能であるため、備品の申請は考えていない。

【消耗品費】必要経費の約60%を消耗品費に充てる。この中には、タンパク質解析用試薬、分子生物学実験用試薬、一般試薬、および形質転換実験のためのプラスチック器具等が含まれる。分子生物学実験用試薬には、RNA抽出用の試薬類、次世代シーケンサーの試薬類、形質転換用のコンストラクト作製試薬類が含まれ、プラスチック器具には、顕微鏡観察のための器具類が含まれる。また、形質転換植物栽培に必要な器材なども、植物栽培器材として消耗品で計上している。

【旅費】分子生物学、生化学、生理学実験手法について、その有効な方法を確立するためには、国内・国外の学会での情報収集が必要である。そのための費用を旅費として計上している。国内学会としては、植物生理学会への参加を予定している。その他の年度については、International Conference on Arabidopsis Researchへの参加を予定している。

【謝金】研究費の約10%を謝金に充てる。和合シグナル分子の分離・同定には、少なくとも一万花以上の*B. rapa*の花粉が必要と推定している。そこで、*B. rapa*の花より薬を採取するために、数名の短期アルバイトを雇用する計画である。

## 13.研究発表(平成23年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名		論文標題			
Hirai, H., Takai, R., Iwano, M., Nakai, M., Kondo, M., Takayama, S., Isogai, A., Che, F.-S.		Glycosylation regulates specific induction of rice immune responses by <i>Acidovorax avenae</i> flagellin			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
The Journal of Biological Chemistry	有	286	2 0 1 1	25519-25530	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
doi:10.1074/jbc.M111.254029					

著者名		論文標題			
Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Susaki, D., Ikeda, Y., Iwano, M., Takayama, S., Higashiyama, T., Kakutani, T., kinoshita, T.		HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in <i>Arabidopsis</i>			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Developmental Cell	有	21	2 0 1 1	589-596	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.devcel.2011.08.013					

著者名		論文標題			
Iwano, M., Takayama, S.		Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Current Opinion in Plant Biology	有	15	2 0 1 2	78-83	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.pbi.2011.09.003					

〔学会発表〕計(5)件 うち招待講演 計(4)件

発表者名		発表標題	
岩野恵、永井里奈、円谷徹之、高山誠司		アブラナ科植物自家・他家受粉過程で機能するCa <sup>2+</sup> 輸送体の探索	
学会等名		発表年月日	発表場所
第27回医学生物学電子顕微鏡技術学会		2011年5月14日	四国大学(徳島)

発表者名		発表標題	
岩野 恵		電子線トモグラフィーによる植物細胞オルガネラの可視化技術の開発	
学会等名		発表年月日	発表場所
植物電子顕微鏡若手ワークショップ2011(招待講演)		2011年11月21日	理化学研究所(神奈川)

発表者名		発表標題	
岩野 恵		アブラナ科植物受粉過程の超高压電顕トモグラフィー解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
超高压電子顕微鏡センター 医学・生物学系共同利用研究報告会(招待講演)		2011年11月22日	大阪大学(大阪)

発表者名		発表標題	
岩野 恵		アブラナ科植物の受粉過程におけるCa <sup>2+</sup> の関与	
学会等名		発表年月日	発表場所
第12回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム(招待講演)		2011年11月26日	浜松市駅ビル「メイワン」、(静岡)

発表者名	発表標題	
Iwano, M., Ito, K., Takayama, S.	Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae	
学会等名	発表年月日	発表場所
XXII International Congress on Sexual Plant Reproduction (招待講演)	2012年2月14日	University of Melbourne (Australia)

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

## 14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

## 15. 備考

--