

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292005

研究課題名(和文) 花粉識別～花粉管伸長・誘導に至る一連の植物受粉システムの分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular understanding of sequential pollination mechanism in plant reproduction.

## 研究代表者

諏訪部 圭太 (Suwabe, Keita)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50451612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物生殖において雌雄配偶子が最初に出会う重要ステップである受粉は、花粉識別、雌しべから花粉への養水分供給、花粉発芽および花粉管伸長・誘導と続く一連の異なる機能の複合的協調により制御されている。本研究は、雌しべ先端の乳頭細胞に限定したLM-NGSトランスクリプトーム情報を基盤に、受粉各ステップに關与する遺伝子を特定し、受粉の3つの鍵ステップ「花粉と雌しべ間の認識・情報伝達」・「花粉への水分供給」・「花粉管の発芽・誘導」因子を見出した。

研究成果の概要(英文)：Pollination is an important early step in sexual plant reproduction. In angiosperms, it comprises a complex series of events, regulated by multiple processes, which must be completed effectively for successful seed production. Sequential pollination events, from pollen adhesion onto the stigma surface to pollen tube germination and elongation, occur on the stigma. In this study, we identified molecular factors in each pollination step, using LM-NGS transcriptome technology in stigmatic papilla cell. This finding will contribute a comprehensive molecular understanding of pollination mechanism in sexual plant reproduction.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物生殖 受粉 柱頭 乳頭細胞 トランスクリプトーム ライブイメージング シロイヌナズナ

### 1. 研究開始当初の背景

植物が次世代を生み出す最初のステップである受粉は、雌しべ柱頭先端の乳頭細胞で誘起され、同種かつ遺伝的特性の異なる花粉を識別する花粉認識機構や、花粉への水分供給、花粉発芽、花粉管誘導など、機能の異なる多様なシステムにより制御されている。乳頭細胞は、これら様々な機能を組み合わせることで適切な花粉のみを受精へと導く最初の門番として機能し、種の存続に貢献している。これらの受粉過程は、1980~90年代に英国オックスフォード大学を筆頭に精力的に研究が行われ、花粉の動態や乳頭細胞内で起きている様々な現象が顕微鏡レベルで組織細胞学的に明らかにされた。しかし、様々な機能の複合体である乳頭細胞を分子レベルで解析する術が当時ではなかったため、受粉を制御する分子メカニズムに関する研究は世界的に置き去りにされていた。

### 2. 研究の目的

Laser microdissection (LM) と次世代シーケンサー (NGS) を組み合わせたターゲット細胞特異的 LM-NGS トランスクリプトーム解析により獲得した乳頭細胞に限定した高精度発現遺伝子リストを基盤に、花粉識別・花粉への水分供給・花粉発芽と花粉管誘導の3つの受粉鍵ステップを制御する因子 (遺伝子) を同定し、「花粉と雌しべ間の情報伝達」・「花粉への水分供給」・「花粉発芽・花粉管誘導」に関する分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

乳頭細胞特異的 LM-NGS トランスクリプトームデータより、「花粉の認識」については「レセプター」「シグナル伝達」Gene Ontology (GO) タームをもつ遺伝子、「水分供給」については「水輸送」「水チャネル」GO タームと「アクアポリンファミリー」に属する遺伝子、「花粉管の発芽・誘導」については「リガンド」および「システインリッチタンパク質」遺伝子を受粉各ステップに關与する候補因子とし、それら各因子のノックアウト変異体を用いた受粉表現型観察や、各種顕微鏡を用いた組織観察、分子生物学的解析、生化学的解析、正常型遺伝子の導入による機能相補解析を行う。また、各種 NGS データを用いたバイオインフォマティクス解析により、候補遺伝子を精査する。

### 4. 研究成果

受粉の分子メカニズムを解明するために、以下の研究を行い成果を得た。

まず最初に、シロイヌナズナ柱頭上における受粉の動態変化を経時的に観察するために、超高倍率実体顕微鏡下で「人工受粉の容易さ」・「観察可能花粉粒数の多さ」・「撮影中の焦点維持」を兼ね備えるタイムラプス観察法 (1分間隔・90分間) を確立した。これにより、通常のシロイヌナズナ花粉は受粉後数

分から30分程度で認識および吸水を完了し、1時間以内に花粉管発芽・伸長に至ることをライブイメージングにより再確認し、博物学的知見が正しいことを裏付けた。本法を用いることにより、突然変異体 (後述) における受粉表現型の異常の有無とその部位を経時的に特定することが可能になった。

次に、LM-NGS トランスクリプトーム解析から選抜した各候補遺伝子をさらに詳細に精査するために、受粉前・自家受粉後・他家受粉後の乳頭細胞を LM により特異的に単離し、NGS 解析により各反応時の乳頭細胞で発現する遺伝子情報を網羅的に単離した。これら NGS データをバイオインフォマティクス解析し、各候補遺伝子の受粉時発現プロファイルを構築した。

以上の解析により精査・選抜した候補遺伝子について、シロイヌナズナストックセンター (ABRC) より T-DNA 挿入突然変異体入手し、育成・観察した。その結果、リガンド因子については1系統 (CR3)、水分供給因子については2系統 (W18とW19)、レセプター因子については1系統 (R1) がそれぞれ受粉表現型に異常が生じることを見出した。

選抜した各ステップの突然変異体について種々の解析を行い、以下の事柄を明らかにした。CR3については、乳頭細胞よりも花粉内部で優占的に遺伝子発現し、花粉細胞質内に局在する CR3 タンパク質が受粉後の花粉発芽を誘起する因子であることを明らかにした。W18とW19については、乳頭細胞内で優占的に発現し、それぞれが機能喪失すると乳頭細胞から花粉への給水に遅延が生じ、二重変異体にすることでその遅延が更に拡大した。つまり、これら2因子が協調的に機能することで、乳頭細胞から花粉への水分供給が制御されていることを明らかにした。R1については、乳頭細胞膜に局在し、細胞外レセプターによる自他認識後の情報を細胞内部に伝達するための雌しべ内情報伝達因子であることを明らかにした。

以上の結果を総括し、受粉の3つの鍵ステップ「花粉と雌しべ間の認識・情報伝達」・「花粉への水分供給」・「花粉管の発芽・誘導」を制御する遺伝子をそれぞれ特定し、受粉各ステップに機能する分子因子を見出した。

### 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9件)

Maeda, S., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Taguchi, M., Yamamura, K., Nagano, K., Endo, T., Saeki, K., Osaka, M., Nabemoto, M., Ito, K., Kudo, T., Kobayashi, M., Kawagishi, M., Fujita, K., Nanjo, H., Shindo, T., Yano, K., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2016) Comparative analysis of microRNA profiles of rice anthers between cool-sensitive and

cool-tolerant cultivars under cool-temperature stress. *Genes Genet. Syst.* 印刷中 (掲載確定). 査読有

Kudo, T., Sasaki, Y., Terashima, S., Matsuda-Imai, N., Takano, T., Saito, M., Kanno, M., Ozaki, S., Suwabe, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Matsuoka, M., Takayama, S., and Yano, K. (2016) Identification of reference genes for quantitative expression analysis using large scale RNA-seq data of *Arabidopsis thaliana* and model crop plants. *Genes Genet. Syst.* 印刷中 (掲載確定). 査読有

諏訪部圭太 (2015) アブラナ科野菜における分子育種の基盤構築とその応用. *JATAFF ジャーナル* 3: 10-16. 査読無

Matsuda, T., Matsushima, M., Nabemoto, M., Osaka, M., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K. K., Okumura, K., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2015) Transcriptional characteristics and differences in *Arabidopsis* stigmatic papilla cells pre- and post-pollination. *Plant Cell Physiol.* 56: 663-673. 査読有

Ohyanagi, H., Takano, T., Terashima, S., Kobayashi, M., Kanno, M., Morimoto, K., Kanegae, H., Sasaki, Y., Saito, M., Asano, S., Ozaki, S., Kudo, T., Yokoyama, K., Aya, K., Suwabe, K., Suzuki, G., Aoki, K., Kubo, Y., Watanabe, M., Matsuoka, M., and Yano, K. (2015) Plant omics data center: an integrated web repository for interspecies gene expression networks with NLP-based curation. *Plant Cell Physiol.* 56: e9. 査読有

Lao, X., Suwabe, K., Niikura, S., Kakita, M., Iwano, M., and Takayama, S. (2014) Physiological and genetic analysis of CO<sub>2</sub>-induced breakdown of self-incompatibility in *Brassica rapa*. *J. Exp. Bot.* 65: 939-951. 査読有

Hiroi, K., Sone, M., Sakazono, S., Osaka, M., Masuko-Suzuki, H., Matsuda, T., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa*. *Ann. Bot.* 112: 115-122. 査読有

Osaka, M., Matsuda, T., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Maeda, S., Sewaki, M., Sone, M., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K. K., Yano, K., Lim, Y. P., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Cell type-specific transcriptome of Brassicaceae stigmatic papilla cells from a combination of laser microdissection and RNA sequencing. *Plant Cell Physiol.* 54: 1894-1906. 査読有

Sudo, K., Park, J. I., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Osaka, M., Kawagishi, M., Fujita, K., Maruoka, M., Nanjo, H., Suzuki, G.,

Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Demonstration *in vivo* of the role of *Arabidopsis* PLIM2 actin-binding proteins during pollination. *Genes Genet. Syst.* 88: 279-287. 査読有

[学会発表] (計 39 件)

Morimoto, H., Arakawa, C., Egusa, W., Masuko-Suzuki, H., Matsushima, M., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2016) Functional analysis of pollen-expressed cysteine-rich protein CR3. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016/03/18-20, 岩手大学 (岩手県盛岡市)

武田征士, 落合功輝, 坂園聡美, 渡辺正夫, 諏訪部圭太 (2016) シロイヌナズナ雌しべの柱頭毛は周囲の湿度を感じて開花後に伸長する. 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016/03/18-20, 岩手大学 (岩手県盛岡市)

寺島伸, 高野智之, 工藤徹, 菅野真麻, 齋藤美沙, 松田典子, 浅野さとみ, 尾崎崇一, 佐々木陽平, 小林正明, 横山幸治, 諏訪部圭太, 鈴木剛, 渡辺正夫, 松岡信, 大柳一, 矢野健太郎 (2015) 複数植物種の遺伝子発現ネットワーク情報と高信頼度機能アノテーション情報を搭載した Web データベース PODC. 日本育種学会第 128 回講演会, 2015/9/11-12, 新潟大学 (新潟県新潟市)

Morimoto, H., Arakawa, C., Matsushima, M., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2015) The pollen-expressed cysteine-rich peptide CR3 involves in pollen germination and pollen tube growth. 26th International Conference on *Arabidopsis* Research, 2015/7/5-9, Paris (France)

Matsushima, M., Morimoto, H., Hikota, Y., Okumura, K., Yano, K., Shimizu, K. K., Takayama, S., Suzuki, G., Watanabe, M. and Suwabe, K. (2015) Revival of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. 26th International Conference on *Arabidopsis* Research, 2015/7/5-9, Paris (France)

Suwabe, K. (2015) Current progress of the pollination biology research. KSM spring meeting, KSM-ICWG-GSP joint clubroot symposium & scientific seminar, 2015/5/15-16, Daejeon & Suncheon (Korea) 招待講演

松田智貴, 松嶋舞, 辺本萌, 大坂正明, 坂園聡美, 増子(鈴木)潤美, 曾根美佳子, 高橋宏和, 中園幹生, 岩野恵, 高山誠司, 清水健太郎, 奥村克純, 矢野健太郎, 鈴木剛, 渡辺正夫, 諏訪部圭太 (2015) LM-RNA-seq による受粉時のシロイヌナズナ雌性生殖組織の機能解析. 日本育種学会第 127 回講演会, 2015/03/21-22, 玉川大学 (東京都町田市)

Matsushima, M., Matsuda, T., Nagasaka, K., Hoshiai, C., Narita, S., Nabemoto, M., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Yano, K., Shimizu, K. K., Takayama, S., Okumura, K., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K.

(2015) Comparative analysis of self-incompatibility factors in genus *Arabidopsis*. 第56回日本植物生理学会年会, 2015/03/17, 東京農業大学 (東京都世田谷区)

Matsuda, T., Matsushima, M., Nabemoto, M., Osaka, M., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Sone, M., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K. K., Yano, K., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2015) Comparative transcriptome analysis between pre- and post-pollination in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Animal Genome XXIII, 2015/1/10-13, San Diego, CA (USA)

Suwabe, K. (2014) Cell type-specific RNA sequencing of papilla cell, a surface cell of pistil, by a combination of laser microdissection and next generation sequencing technologies. The 2nd Plant Genomics Congress, 2014/5/12-13, London (UK) 招待講演

Osaka, M., Matsuda, T., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Maeda, S., Sewaki, M., Sone, M., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K. K., Yano, K., Lim, Y. P., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2014) Cell type-specific transcriptome of Cruciferous stigmatic papilla cells from a combination of laser microdissection and RNA sequencing. Plant and Animal Genome XXII, 2014/1/11-14, San Diego, CA (USA) 招待講演

松田智貴, 大坂正明, 瀬脇みさと, 坂園聡美, 長坂香里, 曾根美佳子, 増子(鈴木)潤美, 岩野恵, 高山誠司, 矢野健太郎, 鈴木剛, 渡辺正夫, 諏訪部圭太 (2013) *Arabidopsis* 属植物における受粉前後の発現遺伝子の比較解析. 第124回日本育種学会講演会, 2013/10-12-13, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

曾根美佳子, 広井健一郎, 坂園聡美, 大坂正明, 鈴木(増子)潤美, 松田智貴, 鈴木剛, 諏訪部圭太, 渡辺正夫 (2013) アブラナ科植物における自家および他家交配時の花粉動態解析. 第124回日本育種学会講演会, 2013/10-12-13, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

Matsuda, T., Osaka, M., Sewaki, M., Sakazono, S., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2013) The *Arabidopsis* stigmatic cell transcriptome by LM-NGS. Plant Biology 2013, 2013/7/20-24, Providence, RI (USA)

Sone, M., Hiroi, K., Sakazono, S., Osaka, M., Masuko-Suzuki, H., Matsuda, T., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Characterization of pollen behavior on self- and cross-pollination in *Brassica rapa*. Plant Biology 2013, 2013/7/20-24, Providence, RI (USA)

Matsuda, T., Osaka, M., Sakazono, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2013) Comprehensive analysis of the *Arabidopsis* stigmatic papilla cell transcriptome. 24th International Conference on *Arabidopsis* Research, 2013/6/24-28, Sydney (Australia)

〔その他〕

ホームページ等

<受賞>

若手農林水産研究者表彰, 農林水産省農林水産技術会議, 2014年11月12日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諏訪部 圭太 (SUWABE, Keita)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号: 50451612

### (2) 研究分担者

渡辺 正夫 (WATANABE, Masao)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 90240522