

修士論文

シロイヌナズナにおけるカルシウム情報伝達を介した
花粉管発芽・伸長制御因子の選抜と解析

2022 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科
資源循環学専攻 農業生物学講座
分子遺伝育種学教育研究分野
並河 俊暁

目次

ページ

緒言	1
----	---

材料および方法	5
---------	---

1. 植物材料
2. 候補遺伝子の選抜
3. ドライ解析
 - 3-1. マルチプルアライメント解析によるアミノ酸比較
 - 3-2. ドメイン検索
 - 3-3. CaM 結合部位予測
 - 3-4. 二次構造予測
 - 3-5. CaM 結合部位の比較
4. T-DNA 挿入系統の遺伝子型確認
5. RT-PCR による発現解析
6. *in vitro* 培地における花粉管発芽観察
7. アニリンブルー染色による受粉後の雌ざい観察
8. 長角果の調査

結果	9
----	---

1. Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した花粉管発芽・伸長を制御する候補因子の選抜
2. 候補遺伝子の機能に関するドライ解析
 - 2-1. マルチプルアライメントによる SAUR39、SAUR49 および SAUR70 のアミノ酸配列の比較
 - 2-2. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 ドメイン検索
 - 2-3. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の CaM 結合部位予測
 - 2-4. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の二次構造予測
 - 2-5. CaM 結合部位予測の比較
3. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の T-DNA 挿入系統の遺伝子型確認
4. RT-PCR による発現解析
5. T-DNA 挿入変異体の *in vitro* 培地における花粉管発芽率の解析

6. アニリンブルー染色による受粉後の雌ずい中での花粉管伸長の解析
7. T-DNA 挿入変異体の稔性の解析

考察	14
----	----

1. ドライ解析を用いた候補遺伝子の選抜
2. T-DNA 挿入変異体を用いた表現型解析
3. *SAUR39*、*SAUR49* に対する機能予測
4. 今後の展望

要約	19
----	----

謝辞	20
----	----

引用文献	21
------	----

図表	30
----	----

緒言

植物生殖の主なステップは「受粉」「花粉管の発芽・伸長」「受精」「種子形成」である。これらの各ステップは一連の流れであるとともに、様々な遺伝子による制御が複雑に関わりあうことで成り立っている。葯から放出された成熟花粉は、乳頭細胞に付着し自他認識される。受け入れが許可された花粉は花粉コートを漏出し、コートと乳頭細胞表面が相互作用することで粘着質（フット）を形成し強く接合する。接合した花粉は乳頭細胞から水や養分を受け取り、花粉管を発芽・伸長させる。花粉管は、柱頭組織に侵入し花柱を通り、胚珠まで到達する。胚珠では花粉管の先端から精細胞が二つ放出され、1つは卵細胞を受精させ、もう一つは中央細胞を受精させる重複受精が行われ、種子が形成される

(Dickinson and Elleman 1994; Stephenson *et al.* 1997)。アブラナ科の受粉過程は大きく「花粉の認識」「花粉の吸水」「花粉管の発芽・伸長」の3つのステップに分けられる。

花粉の認識では、花粉と乳頭細胞の間の情報伝達により乳頭細胞に付着した花粉の自己・非自己の判断を行い、非自己の花粉と認識された花粉のみが以後のステップへ進む。自他認識を行う因子として、花粉側自他認識因子 SP11(S locus protein 11)/SCR(S locus cysteine-rich protein)と雌ずい側自他認識因子 SRK(S receptor kinase)が同定されている (Stein *et al.* 1991; Schpfer *et al.* 1999; Takasaki *et al.* 2000)。自己花粉が乳頭細胞に付着すると SCR と SRK の直接的な結合により不和合反応が起き、次のステップである花粉給水が抑制される。一方、非自己花粉が乳頭細胞に付着すると SCR と SRK が結合せず、不和合反応が起こらないため花粉は給水が行われ、花粉管を発芽・伸長させる。

花粉の吸水は、乾燥状態の花粉へ水や養分を供給することで花粉が不活性状態から活性状態へ切り替えるためのステップであり、受粉システムにおいて重要な機能を担っている。花粉の発芽と伸長に必要な水分と養分は、乳頭細胞表面と花粉コートのタンパクと脂質が相互作用することによってフットが形成される。フット形成中に花粉コートタンパクおよび脂質はキャピラリーシステムを形成し (Murphy 2006)、このシステムにより花粉は乳頭細胞からフットを通じて花粉管発芽・伸長に必要な水分や養分を摂取する (Elleman and Dickinson 1990)。

花粉管の発芽・伸長では、雌しべ先端に付着した花粉が胚珠へと精細胞を運ぶため、花粉管を柱頭内に侵入・伸長させ、胚珠へと誘導させる。花粉管は、一般的な細胞と同じ成長原理に基づいて成長するが、成長活動を花粉管先端に限定することで、侵入性と方向性のある成長を可能にしている (Geitmann *et al.* 2009)。花粉管の急速な極性成長は、細胞骨格ダイナミクス、細胞極性、細胞内の輸送など複数の細胞プロセスの連携に依存している

(Chebli *et al.* 2012; Higashiyama and Takeuchi 2015; Idilli *et al.* 2013; Vidali *et al.* 2001)。花粉管の伸長速度には振動的な変化があり、それはフィードバック機構による制御が原因であることが示唆されている (Hemelryck *et al.* 2017; Kroeger *et al.* 2008)。花粉管伸長速度のフィードバック機構には、細胞質 Ca^{2+} 濃度、細胞膜を通してのイオン流入、先端細胞壁の厚さ、局所酵素濃度など多くの細胞パラメータが同じように振動的に変動し、これらのプロセスのいくつかが花粉管伸長速度に関連していると示唆されている。その中でも振動が顕著なものが、 Ca^{2+} の流入と細胞質内 Ca^{2+} 濃度である (Holdaway *et al.* 1997)。 Ca^{2+} は、細胞外でペクチンと架橋することで細胞壁の生化学的特性に影響を与えるだけでなく、細胞内においてもアクチン結合タンパク質や Rho GTPase の相互作用などによってアクチン細胞骨格のダイナミクスに影響を与えるため、植物細胞の成長において重要な役割を担っており Ca^{2+} が花粉管の成長を制御する一因であるとされている (Gu *et al.* 2005)。

Ca^{2+} は、複数の独立した経路を通じて病原体、植物ホルモン、触覚、乾燥、光、寒冷、熱、酸化ストレス、発生過程などの生物的・非生物的刺激に対する植物の様々な反応に関与するセカンドメッセンジャーとして知られており (Trewavas and Malhø 1998; Rudd and Franklin-Tong 2001)、長距離・短距離のシグナル情報伝達や細胞融合、細胞間シグナル伝達において他のタンパク質を制御し、様々な細胞活動における代謝因子や補因子として働くことが知られている (Sanders *et al.* 1999; Ge *et al.* 2007; Feijó and Wudick 2018)。花粉において Ca^{2+} は、花粉管伸長だけでなく、自家不和合性応答の情報伝達、花粉管の発芽、花粉管の誘導、花粉管の伸長の停止と幅広い機能において重要な要素であることが示されている (Franklin-Tong *et al.* 2002; Steinhörst and Kudla 2013; Ge *et al.* 2007; Higashiyama and Yang 2017; Li *et al.* 2009)。また、花粉管発芽においては、水和した花粉の発芽開口部付近で Ca^{2+} 濃度が高くなることが報告されている (Tirlapur and Cresti 1992)。花粉管伸長では、花粉管先端における Ca^{2+} 濃度の上昇が見られ、 Ca^{2+} 濃度と花粉管伸長速度の間に正の相関がある。さらに、花粉管先端の Ca^{2+} の濃度勾配が変化すると花粉管の成長が阻害され、 Ca^{2+} 濃度勾配を操作することで伸長の変えることができると明らかになっている (Malho *et al.* 1994; Malho *et al.* 1996)。 Ca^{2+} は、*in vitro* 花粉発芽培地 (PGM) において花粉管発芽・伸長に必須成分であり (Brewbaker and Kwack *et al.* 1963)、花粉外部における Ca^{2+} の有無により大きく花粉管の発芽率に違いが生じる。花粉管先端における Ca^{2+} 濃度勾配を維持するためには外部からの Ca^{2+} 供給が必要不可欠であり、 Ca^{2+} 供給には Ca^{2+} チャネルによる花粉管先端への Ca^{2+} 流入が確認されている (Etter *et al.* 1994; Malho *et al.* 1995)。さらに、 Ca^{2+} ポンプによる排出と合わせることで花粉管先端での適切な Ca^{2+} 濃度勾配を保っている

(Schiøtt *et al.* 2004)。

カルシウムによる情報伝達は、 Ca^{2+} センサーとなる Ca^{2+} 結合タンパク質と Ca^{2+} が結合することでシグナルが生成、変更、伝播、認識される。 Ca^{2+} 結合タンパク質には、カルモジュリン (CaM) およびそれに類似したカルモジュリン様タンパク (CML) と、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK)、カルシニューリン B 様タンパク質 (CBL) といった代表的な 3 グループが存在する。これらのタンパク質の共通点として、1 つまたは複数の Ca^{2+} 結合 EF ハンド部位を持っており、そこに Ca^{2+} が結合することで立体構造を変化させ、他のタンパク質を制御できるようになる (Sanders *et al.* 2002; Batistič & Kudla 2012)。CaM は固有の活性を持たないが、4 つの EF ハンド部位それぞれに Ca^{2+} が結合し、EF ハンド部位の Ca^{2+} 結合の組み合わせにより立体構造を変化させる。この構造変化により疎水性表面が現れ、 Ca^{2+} 依存的に標的タンパク質と相互作用する (Strynadka & James 1989)。CaM は真核生物で普遍的に存在する多機能な Ca^{2+} センサーであり、植物の様々な細胞プロセスの制御に関与しており、多様な細胞内経路に影響を及ぼす存在である (Roberts & Harmon 1992; Ohya & Botstein 1994; Vogel 1994; Snedden & Fromm 2001)。シロイヌナズナには 7 種の *CaM* 遺伝子が存在しているだけでなく、CaM のアミノ酸配列に 16%以上の相同性を持つ *CML* 遺伝子が 50 種存在している (McCormack *et al.* 2003)。CML は、CaM の EF ハンド部位を共有しながらも、標的特異性、細胞内局在、 Ca^{2+} 親和性などの機能に影響を与えると考えられる点で CaM と異なる (Roberts & Harmon 1992; Zielinski 1998; Braunewell & Gundelfinger 1999; Haeseleer *et al.* 2002; Luan *et al.* 2002; Zielinski 2002)。CML は、 Ca^{2+} シグナルの多様な役割に貢献するために進化してきたと考えられる。花粉において、一部の CaM や CML が花粉機能に関与することが判明している。*CaM2* は、花粉管において Ca^{2+} チャネルである CNGC18 と CNGC8 の開閉を制御し花粉管発芽や花粉管伸長に影響を与えることが明らかになっている (Landoni *et al.* 2010; Pan *et al.* 2019)。また、*CML24*、*CML25* は花粉管先端において Ca^{2+} 依存的に K^{+} チャネルを制御することが明らかになっている (Yang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015)。これらのように、一部の CaM、CML による花粉管発芽・伸長における影響の報告がある。また、本研究室の花粉トランスクリプトームデータ (松田 2015) より、上記以外の CaM や CML の発現が確認されており、花粉管発芽・伸長を制御するカルシウム情報伝達に関与することが示唆される。しかし、CaM や CML は多様な対象と結合して影響を及ぼすため、花粉内での CaM や CML より下流のカルシウム情報伝達メカニズムは判明していることは少ない。

本研究では花粉管発芽・伸長において重要な要素である Ca^{2+} による情報伝達の分子メカ

ニズムの解明を目的とした。 Ca^{2+} 結合タンパク質のうち CaM は多様な対象と結合し花粉機能に影響を与えることが明らかになっているが、CaM の機能先が多岐にわたるため、CaM 以降の分子メカニズムは判明していることが少ない。そのため、CaM の情報伝達先として CaM 結合性因子に注目した。これに対して、ドライ解析により花粉で発現する CaM 結合性因子の選抜を行い、CaM 結合部位をアミノ酸配列に持つ遺伝子を選抜した。さらに、これらの候補遺伝子が花粉管発芽・伸長に影響を及ぼすかを確かめるため、候補遺伝子の変異体花粉を用いて表現型解析を行った。これらのことを通して、CaM を介した Ca^{2+} 情報伝達により花粉機能へ影響を及ぼす因子の探索と解析を行った。

材料および方法

1. 植物材料

本研究では、アブラナ科シロイヌナズナ属であるシロイヌナズナ（学名 *Arabidopsis thaliana*）を用いた。スタンダードエコタイプである Col-0 をコントロールとして、At3g43120 の T-DNA 挿入変異体 SALK_063426 (*saure39-1*) と、SALK_204538 (*saure39-2*)、SALK_133652 (*saure39-3*)、および At4g34750 の T-DNA 挿入変異体 SALK_134586 (*saure49*)、At5g20810 の T-DNA 挿入変異体 SALK_023753 (*saure70*) の 5 系統を用いた（表 1）。全ての種子は、シロイヌナズナデータベース TAIR（The Arabidopsis Information Resource）より入手した。全ての植物の栽培は、人工気象器（BIOTRON LPH300, NK system）にて、22°C で 16 時間明期、8 時間暗期の日長の条件下で行った。

2. 候補遺伝子の選抜

カルモジュリン（CaM）と結合し、花粉で発現する特徴を遺伝子を選抜するため、Calmodulin binding domain を持つと予測される遺伝子を公開されているデータ（Reddy *et al.* 2002）より選抜した。これらの遺伝子のうち、花粉で発現する遺伝子のトランスクリプトームデータ（松田 2015）より発現量 reads per kilobase of exon per million mapped reads（RPKM）の値が 2 を超える遺伝子のデータを用いて、候補遺伝子の絞り込みを行った。

3. 候補遺伝子のドライ解析

3-1. マルチプルアライメント解析によるアミノ酸比較

各候補遺伝子がコードするアミノ酸配列に共通性が高い保存ドメインあるいはモチーフがあるか調べるため、配列比較を行った。配列比較には、ClustalW（<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>）を用いてマルチプルアライメント解析を行い、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の配列を比較した。

3-2. ドメイン検索

CaM 結合部位の特定と候補遺伝子の機能を予測するため、ドメイン検索を Pfam（<http://pfam.xfam.org/>）を用いて行った。候補遺伝子のアミノ酸配列からデータベースに登録されているドメインとその配列の位置を調べた。

3-3. CaM 結合部位予測

候補遺伝子の CaM 結合部位予測を、Calmodulin Target Database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) より Binding Site Search を用いて行った。0~9 の値で CaM 結合の可能性が高いアミノ酸を示し、それらが連続する領域を CaM 結合部位として予測した。

3-4. 二次構造予測

CaM は α -ヘリックス構造を認識して結合する (Snedden and Fromm 1998; Arazi *et al.* 1995; Snedden *et al.* 1998) ため、タンパク質二次構造での α -ヘリックス構造予測は CaM 結合部位の予測に重要である。そのため、Jpred4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) を用いて候補遺伝子の二次構造予測を行った。これにより、候補遺伝子のアミノ酸配列から α -ヘリックス構造と β -シート構造の二次構造部位を予測した。

3-5. CaM 結合部位の比較

CaM 結合部位が予測された SAUR39 と SAUR49 に対して、CaM との結合が示されている SAUR70 (Popescu *et al.* 2007) と ZmSAUR1 (Yang and Poovaiah 2000) の CaM 結合部位の比較を行った。3-3.マルチプルアライメントによるアミノ酸比較と同様に CaM 結合部位の配列比較を行い、さらに CaM 結合部位の α -ヘリックス構造を pepwheel (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel>) を用いてヘリカルホイール図を作成し比較した。

4. T-DNA 挿入系統の遺伝子型確認

Col-0 と各 T-DNA 挿入系統の植物体から約 3 mm 角の葉をサンプリングし、DNA すいすい-P を用いて DNA を抽出した。PCR には、KOB FX Neo (TOYOBO) を用いて抽出した DNA を鋳型に行った。PCR 反応は、94°C で 2 分熱変性後に、98°C で 10 秒、65°C で 30 秒、68°C で 30 秒を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った。T-DNA 挿入の有無と遺伝子型(ホモ接合あるいはヘテロ接合)の確認を行うため各系統のゲノム DNA に対して T-DNA の隣接配列に基づいた Primer1 と Primer3、また T-DNA 挿入ベクター配列に基づいた共通の LBb1.3 (Primer2) を用いた (表 2)。PCR 産物は、1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色し、Gel Doc XR (BIO-RAD) を用いてゲルを撮影してバンドの有無を確認した。

5. RT-PCR による発現解析

花発達ステージ 13 (Smyth *et al.* 1990) を基準とし、基準とその前後のステージの計 3 つの発達ステージの蕾から RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life technologies) と KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて抽出した total RNA から cDNA を合成し RT-PCR を行った。PCR 反応は、94°C で 2 分熱変性後に、98°C で 10 秒、58°C で 30 秒、68°C で 30 秒を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った。PCR 産物を、1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、Gel Doc XR (BIO-RAD) でゲルの撮影を行い、バンドの光強度を野生型と比較した。

6. *in vitro* 培地における花粉管発芽観察

候補遺伝子への T-DNA 挿入変異による花粉の発芽への影響を調査するため、*in vitro* 培地における花粉管発芽を観察した。

NaOH を用いて pH7.5 に調整した PGM 寒天培地 (H_3BO_3 0.01%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5mM、KCl 5mM、 $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM、スクロース 10%、アガロース 1.5%) をスライドガラスに乗せた金属型に注入して固めた。培地を常温に戻した後、高湿度条件下で 22°C 30 分の後 30°C 30 分でインキュベートを行った花粉を散布した。その後、スライドガラスを高湿度条件にしたシャーレ内に静置し、人工気象器 (BIOTRON LPH300, NK system) 内で 22°C に保ち 16 時間以上経過させ花粉管を十分に発芽・伸長させた後、蛍光顕微鏡 (Axio Imager A2, Carl Zeiss) を用いて観察し、全体の花粉数と発芽した花粉数を計測し花粉管発芽率を算出した。さらに、Col-0 と変異体の花粉管発芽率に対し、t-検定により有意差を求めた。調査した花粉数は、Col-0、*saur39-2*、*saur49* および *saur70* の花粉を $n=493, 202, 150, 110$ 個用いた。

7. アニリンブルー染色による受粉後の雌ずい観察

候補遺伝子の T-DNA 挿入変異による花粉管の伸長への影響を調査するため、人工授粉後の花粉管伸長を観察した。

前日に除雄した Col-0 のステージ 14 の雌しべを 1% アガロースゲルに静置し、Col-0 及び各 T-DNA 挿入系統の花粉を人工授粉させた。受粉から 3、5、8、12 時間経過後に固定液 (EtOH : 酢酸 = 3 : 1) に 1~2 時間浸漬させ、組織を固定・脱色した。次に 1N NaOH に浸漬させ、60°C で 10 分間インキュベートして組織を軟化させた。その後、アニリンブルー染色液 (0.01% アニリンブルー、2% K_3PO_4) に 1 時間以上浸漬させて染色した。染色後の雌ずいを、UV 照射下の蛍光顕微鏡 (Axio Imager A2, Carl Zeiss) を用いて柱頭内部の花粉管を観

察し、それぞれの系統の花粉管長を測定して平均値を算出した。さらに、Col-0 と変異体の花粉管長に対し、t-検定により有意差を求めた。調査した花粉を交配させた雌ずい数は、Col-0、*saar39-2*、*saar49* それぞれの花粉を受粉した雌ずいを 3 時間 n=3、4、4 個 5 時間を n=4、4、3 個 8 時間を n=5、4、3 個 12 時間を n=4、4、4 個 24 時間を n=3、4、2 個用いた。

8. 長角果の調査

候補遺伝子の T-DNA 挿入変異による花粉の受精機能への影響を調査するため、Col-0 および各変異体において結実率と長角果長の測定を行った。

1 cm以上の長さの長角果を選抜し実体顕微鏡 (SZX7、OLYMPUS) を用いて結実数・長角果長を測定し、各系統における平均値を長角果あたりの結実数・長角果長とした。さらに、Col-0 と変異体の結実数・長角果長に対し、t-検定により有意差を求めた。計測には、自家受粉させた長角果を Col-0、*saar39-2*、*saar49* から n=39、56、28 個用いた。さらに、人工授粉させた長角果を Col-0×*saar39-2*、Col-0×*saar49*、*saar39-2*×Col-0、*saar49*×Col-0 から n=23、23、24、18 個用いた。

結果

1. Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した花粉管発芽・伸長を制御する候補因子の選抜

Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した花粉管発芽および花粉管伸長の制御に関わる候補遺伝子の絞り込みを行うため、カルモジュリン (CaM) と結合する可能性があり、かつ花粉で発現する遺伝子を選抜した。Reddy らは、CaM と結合する遺伝子を発現ライブラリーからスクリーニングして CaM 結合タンパク質と CaM 結合ドメインの同定を行い、さらに、それら遺伝子のホモログの配列比較からシロイヌナズナに 100 種類の CaM と結合する可能性のある遺伝子を見出している (Reddy *et al.* 2002)。これらの遺伝子のうち、花粉で発現している遺伝子を選抜するため、花粉で発現・機能している遺伝子を網羅的に解析した花粉トランスクリプトームデータ (松田 2015) と比較した。花粉トランスクリプトームデータより、花粉で発現が見られた遺伝子数は 31994 であった。そのうち、発現量を相対的に示す RPKM の値が 2 を超える遺伝子数は 3276 であった。これらの遺伝子から、CaM と結合する候補遺伝子の選抜を行った結果、12 種類の遺伝子が選抜された (図 1)。これら候補遺伝子のうち本研究では、Small auxin up-regulated RNA (SAUR) ファミリーに着目した。SAUR39、SAUR49、SAUR70 の 3 種は、これまでに花粉での機能が解明されていない。そこで本研究では、これらの遺伝子を花粉のカルシウム情報伝達において、CaM と結合し、花粉機能を制御する新規の候補遺伝子と予想して解析を進めることにした。

2. 候補遺伝子の機能に関するドライ解析

2-1. マルチプルアライメントによる SAUR39、SAUR49 および SAUR70 のアミノ酸配列の比較

SAUR39、SAUR49 および SAUR70 のアミノ酸配列比較を行うため、ClustalW を用いてマルチプルアライメント解析を行った。アライメント解析の結果、SAUR に共通して高度に保存された領域が 2 か所判明した (図 2)。一般的に、SAUR は各末端における相同性が低く、中央領域に SAUR 特異的な約 60 残基程度の SAUR-Specific domain (SSD) を含んでいる (Park *et al.* 2007)。また、シロイヌナズナ、トウモロコシおよび大豆の SAUR ファミリーには CaM 結合ドメインを持つものの存在が報告されており、これらでは、CaM 結合ドメインは 5'末端に存在することが示されている (Yang and Poovaiah 2000; Park *et al.* 2007; Popescu *et al.* 2007)。これらのことから、5'末端に存在する保存領域が CaM 結合ドメイン、中央に存在する保存領域が SSD であると予測した。

2-2. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 ドメイン検索

SAUR39、SAUR49 および SAUR70 のアミノ酸配列を、Pfam を用いてドメイン検索を行った。Pfam (ver35.0) には 19632 のタンパク質ファミリーが登録され、その中から HMMER という検索システムにより高速で精度の高い配列解析を行う。図 3 の模式図は、Pfam 解析により予測されたドメインの位置を示す。詳細な部位を Aliment-Start がアミノ酸配列におけるドメインの予測された開始地点を示し、Aliment-End がアミノ酸配列のドメインにおける予測された終了地点を示す。Bit score が高いほど、予測されたドメインと配列が適合していることを示し、#SEQ には入力した配列ごとの適合値が示されており、適合値が高いと緑で表され、低いと赤で示される。ドメイン検索の結果、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 から Auxin inducible ドメインが高い適合値で検出された (図 3)。また、ドメインとの適合値が高いアミノ酸配列が 2-1 で得られた SSD と Auxin inducible ドメインの位置の含まれている部分に類似しているため、SSD は Auxin inducible ドメインであると予測された。しかし、その他の既知のドメインはいずれの SAUR でも検出されなかった。Auxin inducible ドメインは SAUR タンパク質に保存されているオーキシン応答性ドメインであり、その機能的役割は特定されていない (McClure *et al.* 1989)。したがって、Pfam 解析では SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の機能予測はできなかった。

2-3. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の CaM 結合部位予測

Calmodulin Target Database の Binding Site Search を用いて、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の CaM 結合部位の予測を行った。この予測では、アミノ酸配列の疎水性度、 α -ヘリックス構造の傾向、残基重量、残基電荷、疎水性残基含有量、ヘリカルクラス、特定残基の出現率を判断基準としてアミノ酸配列における CaM 結合部位の予測を数値で表す。SAUR39、SAUR70 のアミノ酸配列からは 5'末端付近に CaM 結合部位が高いスコアで予測された。また、SAUR49 のアミノ酸配列からは二か所の CaM 結合部位が予測された。このうち 2-1 によるアミノ酸配列比較より高度に保存されている 5'末端側に予測されたアミノ酸配列が CaM 結合部位であると予測された (図 4)。

2-4. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の二次構造予測

CaM 結合部位は、 α -ヘリックス構造でタンパク質と結合するため (Zhang 1994)、Jpred4 を用いて SAUR のアミノ酸配列の二次構造の予測を行い、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 のアミノ酸配列に α -ヘリックス構造が存在するか調べた。Jpred4 では、入力したアミノ酸組

成を二次構造の判明している既知のアミノ酸配列と比較することにより、二次構造が予測される。二次構造の予測の結果、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の α -ヘリックス構造が赤色の H で示され、 β シート構造がオレンジ色の E で示された (図 5)。それぞれの配列の 5'末端には α -ヘリックス構造が存在しており、2-3 で予測した CaM 結合部位と類似した位置に存在したため、CaM 結合部位予測の結果が裏付けられた。

2-5. CaM 結合部位予測の比較

SAUR の中には、CaM との結合が判明しているものが存在する。SAUR70 は、様々な CaM やカルモジュリン様タンパク質 (CML) と結合することが報告されており (Popescu *et al.* 2007)、トウモロコシの ZmSAUR1 は CaM と結合すること、および CaM 結合領域がアミノ酸配列の 20-45 に存在することが報告されている (Yang and Poovaiah 2000)。

2-1、2-3 および 2-4 を通して、SAUR39、SAUR49 の CaM との結合をドライ解析で配列の部位を予測してきた。SAUR39 は SAUR70 と相同性が極めて高く、SAUR49 は ZmSAUR1 と相同性が高い。アライメント解析の結果より (図 6A)、SAUR39 と SAUR70、SAUR49 と ZmSAUR1 の CaM 結合部位において高い相同性が見られた。

さらに、 α -ヘリックス構造における疎水性アミノ酸と塩基性アミノ酸による両親媒性を持つ構造が、CaM 結合に重要であることが報告されている (Erickson and Degradó 1987)。SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の CaM 結合部位の α -ヘリックス構造に対して pepwheel を用いてヘリカルホイール構造を解析したところ、青色の四角で疎水性アミノ酸が示され、黒の八角形で囲まれた塩基性アミノ酸が示され、赤色の菱形で中性アミノ酸が示された。SAUR39 と SAUR70、SAUR49 と ZmSAUR1 のアミノ酸の配置が、それぞれのヘリカルホイール構造で類似していた (図 6B)。よって、SAUR39 と SAUR49 は、ドライ解析により CaM と結合することが強く示唆された。

3. SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の T-DNA 挿入系統の遺伝子型確認

SAUR39、SAUR49 および SAUR70 が、CaM と結合して Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した花粉管発芽および花粉管伸長を制御する有力な候補遺伝子であることを明らかにするため、それぞれの遺伝子の T-DNA 挿入変異体を入手して、それら変異体の表現型解析を試みた。

SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>) で各遺伝子の T-DNA 挿入系統を調べたところ、表 1 に示す 5 つの T-DNA 挿入系統が見出され、それぞれ、*saur39-1*、*saur39-2*、*saur49*、*saur70* と命名

した。これらの T3 種子を ABRC より入手して栽培した。各個体での遺伝子型を調べるために、栽培した T-DNA 挿入系統の各個体の葉から抽出した DNA をテンプレートとして、2 種類のプライマーセット (Primer1 と Primer2、Primer1 と Primer3) を用いて PCR を行い、T-DNA 挿入の有無と遺伝子型の判定により T-DNA 挿入ホモ系統を選抜した。その結果、*saure39-1* は 12 個体調べたうちいずれも T-DNA の挿入が確認されず T-DNA 挿入ホモの個体が得られなかった (図 7)。*saure39-2* は、いずれもプライマーセット 1+2 でバンドが確認され、プライマーセット 1+3 でバンドが検出されなかったことより、解析した 12 個体はいずれも T-DNA 挿入ホモ系統であることが判明した (図 8)。*saure39-3* については、#8 の個体でプライマーセット 1+2 でバンドが確認され、プライマーセット 1+3 でバンドが検出されなかったことより、#8 の個体が T-DNA 挿入ホモ系統であることが判明した (図 9)。*saure49* については、#1 と #2 の個体でプライマーセット 1+2 でバンドが確認され、プライマーセット 1+3 でバンドが検出されなかったことより、#1 と #2 の個体が T-DNA 挿入ホモ系統であることが判明した (図 10)。*saure70* では、#2、 #6、 #10 および #11 の個体でプライマーセット 1+2 でバンドが確認され、プライマーセット 1+3 でバンドが検出されなかったことより、#2、 #6、 #10 および #11 の個体が T-DNA 挿入ホモ系統であることが判明した (図 11) これらの 4 系統 (*saure39-2*、*saure39-3*、*saure49*、*saure70*) の T-DNA 挿入ホモ個体を自殖させ種子を得て、以後の解析を行った。

4. RT-PCR による発現解析

RT-PCR により、*saure39-2*、*saure39-3*、*saure49*、*saure70* の T-DNA 挿入ホモ変異体系統の花粉での各 *SAUR* 遺伝子の発現量解析を行った。*saure39-2* と *saure49* は、野生型と比べて発現量の低下が見られた (図 12)。これらの系統は、T-DNA が 5'-UTR に挿入されているため (図 8 および図 10)、mRNA の発現レベルは低下しているものの機能的な *SAUR* タンパク質は発現すると予想され、漏出性のアレルであると示唆された。また、*saure39-3* と *saure70* は野生型と発現量に顕著な違いが見られなかった。*saure39-3* は、T-DNA 挿入が 3'-UTR のため (図 9)、コードする *SAUR39* は機能的であり、以後の解析には用いなかった。*saure70* は、mRNA の発現レベルは野生型とほぼ同レベルであるが、T-DNA がエキソンに挿入されているため機能的な *SAUR70* タンパク質は発現しないと考えられ、機能欠失変異体と示唆された。

5. T-DNA 挿入変異体の *in vitro* 培地における花粉管発芽率の解析

T-DNA 挿入による花粉管発芽への影響を調査するため、*in vitro* 培地において花粉散布から 24 時間後の花粉管の発芽率を測定した (図 13)。その結果、野生型においては発芽率が

67.7%であった。それに対して、*saur39-2* は 50.9%、*saur49* は 36.0%、*saur70* は 54.5%であった。野生型に比べ T-DNA 挿入変異体では、有意に花粉管発芽率の低下が見られた。(図 14)

6. アニリンブルー染色による受粉後の雌ずい中での花粉管伸長の解析

T-DNA 挿入による花粉管伸長への影響を調査するため、受粉から 3、5、8、12 および 24 時間後の雌ずいをアニリンブルー染色し、雌ずい内に侵入した花粉管の花粉管長を測定した(図 15)。野生型と比べ、*saur39-2* 花粉は受粉から 3 時間後の花粉管長において有意に花粉管伸長が低下しており、*saur49* 花粉は受粉から 8 時間後の花粉管長において有意に花粉管伸長が低下していた(図 16)。さらに、全体を通して野生型と変異体の花粉管長の減少の傾向が見られた。

7. T-DNA 挿入変異体の稔性の解析

T-DNA 挿入による花粉機能の種子稔性への影響を調査するため、自家受粉した長角果における 1 つの長角果あたりの種子数を測定した結果、野生型では 38.0 個であったのに対して、*saur39-2* は 44.6 個、*saur49* は 35.9 個となった(図 17)。さらに、花粉がめしべから受ける影響を調査するため、他家受粉を行い 1 つの長角果あたりの種子数を測定した結果、Col-0×*saur39-2* は 32.4 個、Col-0×*saur49* は 29.6 個、*saur39-2*×Col-0 は 32 個、*saur49*×Col-0 は 30.1 個となった(図 18)。これらの結果から、*saur39-2* の結実数は野生型と比べ有意に多いことが観察されたが、他家受粉において花粉やめしべの違いによる稔性の違いや花粉機能低下による稔実数の低下は見られなかった。

また、長角果長を測定した結果、野生型では 12.85 mm であったのに対して、*saur39-2* は 11.82 mm、*saur49* は 11.38 mm となった(図 19)。さらに、花粉がめしべから受ける影響を調査するため他家受粉を行い、1 つの長角果あたりの種子数を測定した結果、Col-0×*saur39-2* は 11.37 mm、Col-0×*saur49* は 12.25 mm、*saur39-2*×Col-0 は 11.56 mm、*saur49*×Col-0 は 11.37 mm となった(図 20)。これらの結果から、*saur49* の長角果長は野生型と比べ有意に低下していることが観察されたが、他家受粉において花粉やめしべの違いによる稔性の違いや花粉機能低下による長角果長の低下は見られなかった。

考察

本研究では、ドライ解析により *SAUR39*、*SAUR49* および *SAUR70* が花粉で発現する CaM 結合因子として選抜され、候補遺伝子のアミノ酸配列やタンパク質二次構造の情報から CaM との結合が強く支持された。さらに花粉の表現型解析により、これらの遺伝子の変異体では花粉管発芽と花粉管伸長に変異の影響が見られた。したがって、*SAUR39*、*SAUR49* および *SAUR70* は CaM と結合することで花粉機能を制御する主要な因子であることが示唆された。

1. ドライ解析を用いた候補遺伝子の選抜

SAUR の構造は、一般的に中央部に相同性の高い約 60 アミノ酸残基のコア配列領域を持っており、両末端における相同性はかなり低い。この相同性の低い 5'末端、3'末端の配列の違いによって SAUR の機能が異なると考えられている。*SAUR39* と *SAUR70* は、類似したコア配列を持つことから同じクレードに属し、同祖遺伝子であることから機能も類似していると予測される。また、*SAUR49* はコア配列の違いにより *SAUR39* や *SAUR70* と別のクレードに属している (Gan 2020)。

本研究のアミノ酸配列の解析から、5'末端に存在すると予測された CaM 結合ドメインにおいて、*SAUR39* と *SAUR70* では 1 アミノ酸残基が R と K の違いのみで高度に保存されている。そして *SAUR70* の CaM との結合は生化学的に証明されており、CaM 結合部位には CaM だけでなく CaM と類似した CML との結合も示されている (Popescu *et al.* 2007)。したがって、*SAUR39* も *SAUR70* と同様に CaM 結合性 SAUR であることが予測される。一方、*SAUR49* の CaM 結合ドメインは、*SAUR39*・*SAUR70* とは異なるクレードに属しているが、トウモロコシの SAUR である *ZmSAUR1* との類似性が確認された。また、*ZmSAUR1* は CaM との結合は生化学的に証明されている (Yang and Poovaiah 2000)。したがって、*SAUR49* も *ZmSAUR1* と同様に CaM 結合性の SAUR であることが予測される。*SAUR39*・*SAUR70* と *SAUR49* では、CaM 結合ドメインがそれぞれ異なることから、それぞれ結合する CaM や CML との選択性が異なるかもしれない。このことから、*SAUR39*・*SAUR70* と *SAUR49* は異なる生物的作用の付与に関係していることが推測される。

2. T-DNA 挿入変異体を用いた表現型解析

T-DNA 挿入変異体の挿入部位と mRNA の発現解析より、*saur39* と *saur49* は漏出性のア

レルであるが、表現型解析においていずれの変異体でも花粉管発芽率と花粉管伸長の低下が観察された。T-DNA 挿入部位がエキソンであることから、*saur70* は機能欠失変異体と考えられ、変異の影響が花粉管発芽率に表れた。*SAUR39* と *SAUR70* は構造が極めて類似しており、機能が重複していると予測される。そして、漏出性のアレルでも *saur39* で *saur70* と類似し強い表現型が現れた。さらに、相対的な発現量を示す RPKM は *SAUR39* が候補遺伝子の中で最も高く 243.6 である。したがって、*SAUR39* が花粉機能において主要な因子であると考察される。しかし、本研究で用いた T-DNA 挿入変異体は *saur39* と *saur49* とともに漏出性のアレルのため、微細な表現型の違いを観察できていない可能性が高い。今後は、*SAUR39* と *SAUR49* のゲノム編集による完全機能欠失変異体を作出することがより正確な表現型解析を行う上で必要とされる。さらに、*saur49* の漏出性のアレルでも *saur39*・*saur70* と同様な表現型が観察されたが、*saur49* は *saur39*・*saur70* と配列の相同性が高くはないため、今回の表現型解析では見出せなかった *saur39*・*saur70* とは異なる表現型が現れる可能性も予想される。完全機能欠失変異体を用いた表現型解析を行うことで、*SAUR39*、*SAUR70* および *SAUR49* が花粉管発芽と花粉管伸長での主要な調節因子であることを明らかにできると考察される。

3. *SAUR39*、*SAUR49* に対する機能予測

SAUR39 および *SAUR49* はドライ解析により CaM との結合部位が予測され、CaM との結合が強く示唆された。T-DNA 挿入変異体では、花粉管発芽、花粉管伸長に影響を与えることが見出された。また、野生型と比べたところ T-DNA 挿入変異体における花粉の機能低下による種子の稔性の低下や種子数ならびに長角果長には変化は見られなかった。

SAUR は、オーキシン応答性遺伝子であることは古くに発見されていたが、SAUR の機能や作用様式が明らかになってきたのは最近になってからである。シロイヌナズナにおいてオーキシン応答性である SAUR が発見されたのが 1994 年であり (Gil *et al.* 1994)、全部で 79 種類の SAUR 遺伝子が存在することが判明している (Ren and Gray 2015)。オーキシンによる細胞伸長は、H⁺が細胞外へ排出される (Rayle and Cleland 1980)。放出された H⁺により、細胞壁の pH が低下する。これによりセルロースの分解酵素であるエクспанシンの活性が上昇する。細胞壁の構成要素であるセルロースが分解されることで細胞壁が緩み、細胞の成長が誘導される。この酸性成長理論が、オーキシンによる細胞伸長の分子メカニズムである考えられている (Rayle and Cleland 1970)。酸性成長理論における SAUR の役割として、オーキシンにより発現量が上昇した SAUR が PP2C.D ファミリーのプロテインホスファター

ぜと結合することで、細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化を阻害することが報告されている (Spartz *et al.* 2014; Spartz *et al.* 2017)。これにより H^+ -ATPase の活性が増加し、 H^+ が細胞外に放出され、細胞壁を軟化させることで細胞伸長へと繋がる。また、SAUR の過剰発現は、様々な植物の葉、茎、および花器において成長を誘導し得ることが明らかにされている (Jain *et al.* 2006; Wu *et al.* 2012; Xie *et al.* 2015; van Mourik *et al.* 2017; Hu *et al.* 2018)。これらのことから、大部分の SAUR の機能は、オーキシンにより発現量を増加させ、PP2C.D との相互作用により PP2C.D の機能を阻害することで、細胞膜に存在する H^+ -ATPase の活性を増加させ、酸性成長理論における細胞成長の誘導に関わっているのではないかと考えられている。

また、いくつかの SAUR を過剰発現させた際、細胞成長以外の機能として報告されているものが存在する。SAUR10、SAUR36、およびイネ遺伝子 OsSAUR39 の過剰発現系統では、早期老化表現型が観察されており (Kant *et al.* 2009; Hou *et al.* 2013; Bemer *et al.* 2017b)、老化の重要な負の調整因子として知られ、細胞質に局在を示す PP2C.D の一種である Senescence-Suppressed Protein Phosphatase (SSPP) との関連性が示唆されている (Xiao *et al.* 2015)。また、SAUR32 の過剰発現は、暗所での子葉成長の減少と先端フックの不形成をもたらす。この遺伝子はオーキシンや光に反応せず、核に局在を示している (Park *et al.* 2007; Sun *et al.* 2016)。核に優勢に局在する SAUR76 の過剰発現は細胞伸長を促進しないが、組織の分裂性活性に影響を与え、葉の細胞はより少なく根の細胞はより多くなる (Markakis *et al.* 2013)。これらのように細胞伸長以外の機能に関わっていたり、オーキシン以外からの影響を受け発現量を変化させ、様々な部位で PP2C.D 以外と結合して働く SAUR も存在する。

本研究において、候補遺伝子として選抜した SAUR49 は、葉の老化を遅らせる機能を持つ SSPP と結合し、SSPP の機能を抑制することで葉の老化の正の調整因子として働くことが明らかになっている (Wen *et al.* 2019)。SSPP は、Senescence-Associated Receptor-Like Kinase (SARK) を脱リン酸化し、葉の老化を負に制御する (Xu *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2015)。それに対して、SAUR49 が SSPP と結合し、SSPP の機能を阻害することで葉の老化が促進される。また、PP2C.D タンパク質は、細胞膜に存在する H^+ -ATPase の脱リン酸化を促進することで H^+ -ATPase の H^+ の排出機能を抑制する役割を持つ。これに対して、SAUR が PP2C.D と結合しその機能を阻害することで、細胞膜の H^+ -ATPase の機能が促進され H^+ が放出されるようになる。SSPP においても、他の PP2C.D タンパク質と同様に H^+ -ATPase との関係性が述べられており、SAUR49 を過剰発現させることで細胞膜の H^+ -ATPase の活性が上昇することが報告されている。さらに、SAUR49 だけでなく、SAUR30、SAUR39、SAUR41 および SAUR72 も SSPP との結合が示され、それらの SAUR の機能が SAUR49 の機能と重複して

いることが予測されている (Wen *et al.* 2019)。このように SAUR49 は、SSPP と結合し SSPP の機能を阻害することで、細胞膜に存在する H^+ -ATPase の機能を促進することが示されている。さらに、本研究で候補遺伝子とした SAUR39 においても SSPP との結合が示されたことから、SAUR49 と同様に働き、SAUR30、SAUR41 および SAUR72 とともに重複して機能していることが考察される。

花粉において H^+ -ATPase は重要な役割を司ることが知られている。花粉管伸長における花粉管先端の H^+ 濃度勾配は、 Ca^{2+} の濃度勾配と同様に重要な要素であることが予測されている (Felle 2001)。この花粉管先端における H^+ 濃度勾配は、花粉管全体の細胞膜の H^+ -ATPase からの H^+ の流出と、先端の H^+ チャネルにおける H^+ の吸収により成り立っている。この H^+ 濃度勾配の調節において H^+ -ATPase は、花粉において H^+ の排出を行う重要な存在である。AHA6、AHA8 および AHA9 は、花粉管先端を除く花粉と花粉管の細胞膜で主に発現している細胞膜 H^+ -ATPase である。これらの三重変異体において、*in vitro* 花粉管発芽率が低下し、花粉管の伸長においても不規則な花粉管伸長を示し、野生型と比べて花粉管長が大幅に低下することが見出されている。また、胚珠へ到達する花粉管が減少するため、種子数が大幅に減少することが報告されている (Hoffmann *et al.* 2020)。このように、 H^+ 排出を制御する H^+ -ATPase は、花粉管発芽・伸長において重要な要素である。

これらのことから SAUR39 と SAUR49 の花粉における分子メカニズムを考察すると、高 Ca^{2+} 濃度の花粉管先端において、SAUR39、SAUR49 は CaM 結合により立体構造を変化させ、本来の結合相手である SSPP と結合しなくなる。SSPP が活性化することにより花粉管の細胞膜に存在する H^+ -ATPase の脱リン酸化が起こる。そうすることで、花粉管先端での H^+ の放出を防ぎ、花粉管先端において高 H^+ 濃度を維持する。また、花粉管 Ca^{2+} 濃度の低い部位では CaM が機能せず SAUR と結合しないため、SAUR39、SAUR49 が正常に働き、SSPP の機能を阻害する。これにより H^+ -ATPase が正常に働き、 H^+ の細胞外へ放出する。このように SAUR は、 Ca^{2+} 濃度の情報により花粉管内での H^+ の濃度勾配を調整している存在である可能性が考えられる。この可能性は、花粉管先端における H^+ に対する Ca^{2+} の負のフィードバック調節の予測 (Hayashi *et al.* 2021) から裏付けられる。この予測では、(1) 細胞膜 H^+ -ATPase が活性化しているときに花粉管伸長が可能であること (2) 成長が Ca^{2+} 流入を刺激すること、(3) Ca^{2+} 流入によって細胞膜 H^+ -ATPase 活性を阻害することが、フィードバック調節における条件とされている。本研究で見出した SAUR は、この予測の (3) における SAUR による Ca^{2+} 流入を感知し、 H^+ -ATPase の活性が下がる機構に関与しているのかもしれない。

4. 今後の展望

ドライ解析により、SAUR39 と SAUR49 が CaM 結合性 SAUR との相同性から CaM と結合することが予測された。それに対して、SAUR49 と CaM の結合実験による生化学的解明による証明が必要とされる。また同様に、SAUR39 と SAUR49 は PP2C.D タンパク質である SSPP との結合が確認されているが、SAUR70 においても PP2C.D タンパク質と結合することを生化学的に解明する必要がある。これらの結果を通して、分子メカニズムの予測の検証が必要である。

本研究において、T-DNA 挿入変異体の表現型解析に *saur39* と *saur49* の漏出性のアレルを T-DNA 挿入変異体として表現型解析に用いた。表現型解析において T-DNA 挿入変異体において野生型との間に表現型に差が見られたが、正確かつ微細な表現型の差異までは見ることができなかった。そこで今後の課題として、SAUR39、SAUR49 のゲノム編集による完全機能欠失変異体の作出が詳細な表現型解析に必要とされる。また、機能の重複が予測されるため、SAUR39、SAUR49 および SAUR70 の完全機能欠失変異体の二重変異体、三重変異体の作成による表現型解析も必要とされる。これらの表現型解析により、各 SAUR の花粉の各機能における調節因子としての重要性を解明する必要がある。

要約

植物において生殖は、次世代となる種子を残すうえで重要なイベントである。花粉は、雌しべ先端に付着し、花粉管を発芽・伸長させ精細胞を胚珠に届ける働きをしており、生殖における重要な役割を持つ存在である。花粉が正常に発達する上で、雌しべから供給される水分・養分のうち Ca^{2+} は非常に重要な要素である。 Ca^{2+} は、花粉内でセカンドメッセンジャーとして働き、花粉管発芽・伸長や花粉管の誘導など幅広い機能に関わる存在であることが判明している。しかし、 Ca^{2+} を介したそれらの花粉機能の詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。 Ca^{2+} による情報伝達は、 Ca^{2+} が Ca^{2+} 結合タンパク質と結合することで始まる。代表的な Ca^{2+} 結合タンパク質の一種であるカルモジュリン (CaM) は、一部において花粉機能との関連性が発見されているが、CaM が花粉機能へ影響を及ぼす詳細な分子メカニズムの解明には至っていない。

そこで本研究では、CaM と結合することで Ca^{2+} 流入情報を受け取り、花粉機能を制御する因子の探索と分子メカニズムの解明を目的として研究を行った。まず、ドライ解析による花粉機能制御因子の候補遺伝子の選抜を行った。次に、候補遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いた表現型解析を行い、ドライ解析で選抜した候補遺伝子が花粉機能へ及ぼす影響を検証した。ドライ解析により、*SAUR39*、*SAUR49* および *SAUR70* が CaM と結合し花粉機能を制御する因子の候補に挙げられた。*SAUR39*、*SAUR49* および *SAUR70* の T-DNA 挿入変異体の表現型解析の結果、花粉管発芽と花粉管伸長に変異の影響が見られた。したがって、*SAUR39*、*SAUR49* および *SAUR70* は、CaM と結合することで花粉機能を制御する主要な因子であることが強く示唆された。

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成あたり、4年間に渡り御指導、御鞭撻を賜りました諏訪部圭太先生に心より厚くの御礼を申し上げます。本研究を行うにあたり、研究面での多大な御指導、御協力を賜りました三重大学地域イノベーション推進機構先端科学研究支援センター植物ゲノミクス部門加賀谷安章先生に深く感謝申し上げます。また、快適な研究環境のご提供等、様々な面において本研究を温かくお守りしていただいた掛田克行先生に心より深く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多大なる御指導、御協力を頂いた寫田尋人さんに深く感謝いたします。また、同輩として日々切磋琢磨し、共に励ましあい、いつも心地よい研究室にしてくれた早川杏奈さんに感謝申し上げます。日々の研究室を温かく楽しい雰囲気ですべてくださった。Endang Ayu Windari さん、大平慧真さん、岡村昂生さん、田中千風優さん、松葉涼希さんに深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を行った2年間を含め大学生活6年間に渡って温かく見守って下さり、経済的、精神的にも厚く援助して下さった家族、先輩方、友人の皆様に心より感謝の意を表させていただきます。

引用文献

- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W. A., Shelp, B. J., & Fromm, H. (1995). Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiology*, 108(2), 551-561.
- Batistič, O., & Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(8), 1283-1293.
- Bemer, M., van Mourik, H., Muiño, J. M., Ferrándiz, C., Kaufmann, K., & Angenent, G. C. (2017). FRUITFULL controls SAUR10 expression and regulates Arabidopsis growth and architecture. *Journal of experimental botany*, 68(13), 3391-3403.
- Brewbaker, J. L., & Kwack, B. H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American journal of botany*, 50(9), 859-865.
- Chebli, Y., Kaneda, M., Zerzour, R., & Geitmann, A. (2012). The cell wall of the Arabidopsis pollen tube—spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiology*, 160(4), 1940-1955.
- Dickinson, H. G., & Elleman, C. J. (1994). Pollen hydrodynamics and self-incompatibility in *Brassica oleracea*.
- Elleman, C. J., & Dickinson, H. G. (1990). The role of the exine coating in pollen–stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytologist*, 114(3), 511-518.
- Erickson-Viitanen, S., & Degrado, W. F. (1987). [37] Recognition and characterization of calmodulin-binding sequences in peptides and proteins. *Methods in enzymology*, 139, 455-478.
- Etter, E. F., Kuhn, M. A., & Fay, F. S. (1994). Detection of changes in near-membrane Ca^{2+} concentration using a novel membrane-associated Ca^{2+} indicator. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 10141-10149.

- Felle, H. H. (2001). pH: signal and messenger in plant cells. *Plant biology*, 3(06), 577-591.
- Franklin-Tong, V. E., Holdaway-Clarke, T. L., Straatman, K. R., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2002). Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal*, 29(3), 333-345.
- Feijó, J. A., & Wudick, M. M. (2018). Calcium is life. *Journal of Experimental Botany*, 69(17), 4147.
- Gan, X., Jing, Y., Shahid, M. Q., He, Y., Baloch, F. S., Lin, S., & YANG, X. H. (2020). Identification, phylogenetic analysis, and expression patterns of the SAUR gene family in loquat (*Eriobotrya japonica*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(1), 15-23.
- Gaude, T., & Dumas, C. (1984). A membrane-like structure on the pollen wall surface in *Brassica*. *Annals of Botany*, 54(6), 821-825.
- Ge, L. L., Tian, H. Q., & Russell, S. D. (2007). Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. *American Journal of Botany*, 94(6), 1046-1060.
- Higashiyama, T., & Yang, W. C. (2017). Gametophytic pollen tube guidance: attractant peptides, gametic controls, and receptors. *Plant physiology*, 173(1), 112-121.
- Geitmann, A., & Ortega, J. K. (2009). Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends in plant science*, 14(9), 467-478.
- Gil, P., Liu, Y., Orbovic, V., Verkamp, E., Poff, K. L., & Green, P. J. (1994). Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 104(2), 777-784.
- Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S., & Yang, Z. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *The Journal of cell biology*, 169(1), 127-138.

Hayashi, M., & Palmgren, M. (2021). The quest for the central players governing pollen tube growth and guidance.

Higashiyama, T., & Takeuchi, H. (2015). The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annual review of plant biology*, 66, 393-413.

Hoffmann, R. D., Portes, M. T., Olsen, L. I., Damineli, D. S. C., Hayashi, M., Nunes, C. O., ... & Palmgren, M. (2020). Plasma membrane H⁺-ATPases sustain pollen tube growth and fertilization. *Nature communications*, 11(1), 1-15.

Holdaway-Clarke, T. L., Feijó, J. A., Hackett, G. R., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *The Plant Cell*, 9(11), 1999-2010.

Hou, K., Wu, W., & Gan, S. S. (2013). SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(2), 1002-1009.

Hu, W., Yan, H., Luo, S., Pan, F., Wang, Y., & Xiang, Y. (2018). Genome-wide analysis of poplar SAUR gene family and expression profiles under cold, polyethylene glycol and indole-3-acetic acid treatments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 50-65.

Idilli, A. I., Morandini, P., Onelli, E., Rodighiero, S., Caccianiga, M., & Moscatelli, A. (2013). Microtubule depolymerization affects endocytosis and exocytosis in the tip and influences endosome movement in tobacco pollen tubes. *Molecular plant*, 6(4), 1109-1130

Jain, M., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2006). Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive SAUR gene family in rice (*Oryza sativa*). *Genomics*, 88(3), 360-371.

Kant, S., Bi, Y. M., Zhu, T., & Rothstein, S. J. (2009). SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as

a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant physiology*, 151(2), 691-701.

Knauss, S., Rohrmeier, T., & Lehle, L. (2003). The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23936-23943.

Kroeger, J. H., Geitmann, A., & Grant, M. (2008). Model for calcium dependent oscillatory growth in pollen tubes. *Journal of Theoretical Biology*, 253(2), 363-374.

Landoni, M., De Francesco, A., Galbiati, M., & Tonelli, C. (2010). A loss-of-function mutation in Calmodulin2 gene affects pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 74(3), 235-247.

Li, D. X., Lin, M. Z., Wang, Y. Y., & Tian, H. Q. (2009). Synergid: a key link in fertilization of angiosperms. *Biologia plantarum*, 53(3), 401-407.

Malho, R., Read, N. D., Pais, M. S., & Trewavas, A. J. (1994). Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *The Plant Journal*, 5(3), 331-341.

Malhó, R., Read, N. D., Trewavas, A. J., & Pais, M. S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *The Plant Cell*, 7(8), 1173-1184.

Malho, R., & Trewavas, A. J. (1996). Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *The Plant Cell*, 8(11), 1935-1949.

Markakis, M. N., Boron, A. K., Van Loock, B., Saini, K., Cirera, S., Verbelen, J. P., & Vissenberg, K. (2013). Characterization of a small auxin-up RNA (SAUR)-like gene involved in *Arabidopsis thaliana* development. *PloS one*, 8(11), e82596.

松田智貴 (2015) アブラナ科植物における雌性生殖細胞の分子情報基盤構築と受粉応答遺伝子のバイオインフォマティクス解析

- McClure, B. A., Hagen, G., Brown, C. S., Gee, M. A., & Guilfoyle, T. J. (1989). Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *The Plant Cell*, 1(2), 229-239.
- McCormack, E., & Braam, J. (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 159(3), 585-598.
- Murphy, D. J. (2006). The extracellular pollen coat in members of the Brassicaceae: composition, biosynthesis, and functions in pollination. *Protoplasma*, 228(1), 31-39.
- Ohya, Y., & Botstein, D. (1994). Diverse essential functions revealed by complementing yeast calmodulin mutants. *Science*, 263(5149), 963-966.
- Park, J. E., Kim, Y. S., Yoon, H. K., & Park, C. M. (2007). Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in *Arabidopsis*. *Plant science*, 172(1), 150-157.
- Pan, Y., Chai, X., Gao, Q., Zhou, L., Zhang, S., Li, L., & Luan, S. (2019). Dynamic interactions of plant CNGC subunits and calmodulins drive oscillatory Ca²⁺ channel activities. *Developmental Cell*, 48(5), 710-725.
- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Seay, M., Gerstein, M., ... & Dinesh-Kumar, S. P. (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4730-4735.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., & Davis, R. W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes & development*, 7(6), 974-985.
- Rayle, D. L., & Cleland, R. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions.

Plant physiology, 46(2), 250-253.

Rayle, D. L., & Cleland, R. E. (1980). Evidence that auxin-induced growth of soybean hypocotyls involves proton excretion. *Plant physiology*, 66(3), 433-437.

Reddy, V. S., Ali, G. S., & Reddy, A. S. (2002). Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the Arabidopsis Genome 210. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 9840-9852.

Ren, H., & Gray, W. M. (2015). SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Molecular plant*, 8(8), 1153-1164.

Roberts, D. M., & Harmon, A. C. (1992). Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual review of plant biology*, 43(1), 375-414.

Rudd, J. J., & Franklin-Tong, V. E. (2001). Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytologist*, 151(1), 7-33.

Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691-706.

Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S401-S417.

Schiøtt, M., Romanowsky, S. M., Bækgaard, L., Jakobsen, M. K., Palmgren, M. G., & Harper, J. F. (2004). A plant plasma membrane Ca^{2+} pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9502-9507.

Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science*, 286(5445), 1697-1700.

Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in

Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.

Snedden, W. A., Koutsia, N., Baum, G., & Fromm, H. (1996). Activation of a Recombinant *Petunia* Glutamate Decarboxylase by Calcium/Calmodulin or by a Monoclonal Antibody Which Recognizes the Calmodulin Binding Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4148-4153.

Snedden, W. A., & Fromm, H. (1998). Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*, 3(8), 299-304.

Snedden, W. A., & Fromm, H. (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist*, 151(1), 35-66.

Spartz, A. K., Ren, H., Park, M. Y., Grandt, K. N., Lee, S. H., Murphy, A. S., ... & Gray, W. M. (2014). SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5), 2129-2142.

Spartz, A. K., Lor, V. S., Ren, H., Olszewski, N. E., Miller, N. D., Wu, G., ... & Gray, W. M. (2017). Constitutive expression of *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA19 (SAUR19) in tomato confers auxin-independent hypocotyl elongation. *Plant Physiology*, 173(2), 1453-1462.

Stephenson, A. G., Doughty, J., Dixon, S., Elleman, C., Hiscock, S., & Dickinson, H. G. (1997). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating. *The Plant Journal*, 12(6), 1351-1359.

Steinhorst, L., & Kudla, J. (2013). Calcium-a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(7), 1573-1581.

Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8816-8820.

Strynadka, N. C., & James, M. N. (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 951-999.

Sun, N., Wang, J., Gao, Z., Dong, J., He, H., Terzaghi, W., ... & Chen, H. (2016). Arabidopsis SAURs are critical for differential light regulation of the development of various organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 6071-6076.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., & Hinata, K. (2000). The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature*, 403(6772), 913-916.

Tirlapur, U. K., & Cresti, M. (1992). Computer-assisted video image analysis of spatial variations in membrane-associated Ca^{2+} and calmodulin during pollen hydration, germination and tip growth in *Nicotiana tabacum* L. *Annals of Botany*, 69(6), 503-508.

Van Hemelryck, M., Bernal, R., Rojas, E., Dumais, J., & Kroeger, J. H. (2017). A fresh look at growth oscillations in pollen tubes: kinematic and mechanistic descriptions. In *Pollen Tip Growth* (pp. 369-389). Springer, Cham.

van Mourik, H., van Dijk, A. D., Stortenbeker, N., Angenent, G. C., & Bemer, M. (2017). Divergent regulation of Arabidopsis SAUR genes: a focus on the SAUR10-clade. *BMC plant biology*, 17(1), 1-14.

Vidali, L., McKenna, S. T., & Hepler, P. K. (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular biology of the cell*, 12(8), 2534-2545.

Vogel, H. J. (1994). Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochemistry and cell biology*, 72(9-10), 357-376.

Wang, S. S., Diao, W. Z., Yang, X., Qiao, Z., Wang, M., Acharya, B. R., & Zhang, W. (2015). A *Arabidopsis thaliana* CML 25 mediates the Ca^{2+} regulation of K^{+} transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation. *Plant, cell & environment*, 38(11), 2372-2386.

Wu, J., Liu, S., He, Y., Guan, X., Zhu, X., Cheng, L., ... & Lu, G. (2012). Genome-wide analysis of SAUR gene family in Solanaceae species. *Gene*, 509(1), 38-50.

Xiao, D., Cui, Y., Xu, F., Xu, X., Gao, G., Wang, Y., ... & Wang, N. N. (2015). SENESCENCE-SUPPRESSED PROTEIN PHOSPHATASE directly interacts with the cytoplasmic domain of SENESCENCE-ASSOCIATED RECEPTOR-LIKE KINASE and negatively regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 169(2), 1275-1291.

Xie, R., Dong, C., Ma, Y., Deng, L., He, S., Yi, S., ... & Zheng, Y. (2015). Comprehensive analysis of SAUR gene family in citrus and its transcriptional correlation with fruitlet drop from abscission zone A. *Functional & integrative genomics*, 15(6), 729-740.

Xu, F., Meng, T., Li, P., Yu, Y., Cui, Y., Wang, Y., ... & Wang, N. N. (2011). A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its Arabidopsis homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant physiology*, 157(4), 2131-2153.

Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2000). Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3137-3143.

Yang, X., Wang, S. S., Wang, M., Qiao, Z., Bao, C. C., & Zhang, W. (2014). Arabidopsis thaliana calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca²⁺ concentration. *Plant molecular biology*, 86(3), 225-236.

Zhang, M., & Vogel, H. J. (1994). The Calmodulin-Binding Domain of Caldesmon Binds to Calmodulin in an α -Helical Conformation. *Biochemistry*, 33(5), 1163-1171.

図表


候補遺伝子の選抜

カルモジュリンと結合

CaM結合予測遺伝子: 100種
(Reddy *et al.* 2002)

花粉で発現

花粉でRPKM2以上の遺伝子
(松田 2015)



Gene ID	description	Pollen RPKM
At3g43120	SAUR39	243.617
At3g21180	ACA9.g	46.0615
At1g02780	Ribosomal L19.c	16.5577
At4g34750	SAUR49	13.4961
At4g01010	CNGC-like.l	6.4437
At2g43040	APCBP.a	5.74254
At4g02230	Ribosomal L19.b	5.57427
At2g43120	Pirin-like.a	3.94031
At3g57330	ACA.c	2.98123
At5g20810	SAUR70	2.52097
At2g38800	Hypothetical	2.29402
At3g16780	Ribosomal L19.a	2.06944



変異体の花粉管発芽および花粉管伸長の表現型解析

図1. Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した花粉管発芽および花粉管伸長を制御する遺伝子の同定に向けた戦略

Ca^{2+} イオンの濃度情報を媒介した、花粉管発芽および花粉管伸長の制御に関わる候補遺伝子の絞り込みを行うため、カルモジュリンと結合する可能性があり、かつ花粉で発現する遺伝子を選抜した。こうして得られた遺伝子の中で、同一ファミリーかつ花粉において遺伝子の機能が解明されていないSAUR39, SAUR49およびSAUR70に注目した。これらのカルモジュリン結合性の解析と、これらの変異体での花粉管発芽および花粉管伸長の表現型を解析することで、花粉での Ca^{2+} イオン濃度情報を媒介する制御因子であることの証明を試みた。

A

CaM-binding domains

SAUR39 MDENNAAKLTGIKQIVRLKEILQKWQTVTIGTSKSDDGELGA-RKHTAIIS
SAUR70 MDENNAAKLTGIRQIVRLKEILQKWQTVTIGPKSEVPPLAAGKQAVAMIS
SAUR49 -----MGKNNKIGSVVRIRQMLKQWQKKAHIGSSNN-----
 .* . * .:***:::*::** . : .*:

SAUR39 PVINKRLLDLKTCDSDDEETTCQSPEPPPDVPGGYLAVYVGPELRRFIIPT
SAUR70 PAINKRLLDVKNGDSDEE-TCQSPEPPHDVPGKNLAVYVGPELRRFIIPT
SAUR49 -----DPVSDVPPGHVAVSVGENRRRYVVRA

SAUR-specific domain (SSD):* *** * :** ** : **::: :

SAUR39 NFLSHSLFKVLLEKAEEEYGFHDHGALTIPCEVETFKYLLKCIENHPKDD
SAUR70 SYLSHSLFKVLLEKAEEEFGFDQSGALTIPCEVETFKYLLKCMENNLKDL
SAUR49 KHLNHPIFRLLAEAEEEYGFANVGPLAIPCDESLFEDIIAIVTRCESSS
 ..*.*.:*: ** :*****:** : *.*:***: . *: :: : . ..

SAUR39 TSA--EDPVETEE-----
SAUR70 HPD--DNSGKPPKDQLLPRDHTMNSNPGGQPRLNPGTGLKSKP
SAUR49 SSGRGNPPAATLEDLRRCSHVGLAKNNVESRPLLPGIAEKSVC
 : : : : :

B



図2. SAUR39、SAUR49およびSAUR70のアミノ酸配列の類似性の解析

(A) SAUR39、SAUR49およびSAUR70について、ClustalWを用いてアライメント解析を行った。5'末端のCaM-bindingドメインと中央に、SAUR特異的ドメイン(SSD)が高度に保存されていることが見出された。それら以外に保存されたドメイン/モチーフは検出されなかった。

(B) 一般的なCaM結合性SAURの構造 (Park *et al.* 2007)

A



Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value
				Start	End	Start	End	From	To			
Auxin_inducible	Auxin responsive protein	Domain	n/a	16	142	64	142	17	90	90	91.3	3.4e-26
#HMM	a....as.sssssvpekChvYvvderrRFvvpIeyLnhpVfrelLrrseeeefgfdsgpItpCdvaVfeyvIsI											
#MATCH	+ ++ + + +vp kG+++Yyvg e rRF++p+++L+h +f+ LL+++eee+gfd++g ItpC+v+ f+y+l+++											
#PP	13344333346778999,xx975											
#SEQ	SdeettCUsPEPPDVR-KGYLAVYVGPRLRRFIIPTINFLSHSLFKVLLKAEEEYGFQHSGLTIPCEVEIFKYLLKQ											

B



Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value
				Start	End	Start	End	From	To			
Auxin_inducible	Auxin responsive protein	Domain	n/a	11	100	12	99	2	89	90	94.3	4.0e-27
#HMM	rIkqIak...krIksaaasssssvpekChvYvvderrRFvvpIeyLnhpVfrelLrrseeeefgfdsgpItpCdvaVfeyvIsI											
#MATCH	r++q++k k+ +l ss+ ++ s+vp Chv+Vg++rrR+v++++Lnhp+fr LL +teee+gf++ gpl ipCd+++fe++++											
#PP	677888664333443333,46788999,xx975											
#SEQ	RnmlKgwKKAHIGSSN--TDNRDVR-HGVAVSVGENRRRYVYRAHLNHRIFRRLAEAEYGFANVGFLAIPQESLFEETLAI											

C



Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value
				Start	End	Start	End	From	To			
Auxin_inducible	Auxin responsive protein	Domain	n/a	17	142	67	141	17	89	90	93.4	8.0e-27
#HMM	a..as.sssssvpekChvYvvderrRFvvpIeyLnhpVfrelLrrseeeefgfdsgpItpCdvaVfeyvIsI											
#MATCH	+ ++ + + +vp kG ++Yyvg e rRF++p++yL+h ++ LL+++eee+gfd++g ItpC+v+ f+y+l+++											
#PP	1333345788999x,xx987											
#SEQ	FetCUsPEPPDVR-KGYLAVYVGPRLRRFIIPTISYLSHSLFKVLLKAEEEYGFQHSGLTIPCEVEIFKYLLKQ											

図3. SAUR39、SAUR49およびSAUR70のドメイン検索の結果

(A) SAUR39、(B) SAUR49、(C) SAUR70のアミノ酸配列から、Pfamを用いてドメイン検索を行い、アミノ酸配列上のドメインの位置を予測した。いずれもSAURファミリーに特異的なAuxin inducibleドメインが、高度に保存されていることが見出された。

A

```

....1 MDENNAAKLT GIKQIVRLKE ILQKWQTVTI GSKSDDGELG ARKHTAIISP
..... 0022477777 7777999999 9977422222 2222000000 0000000000

...51 VINKRLDLK TCDSDDEETC QSPEPPDPVP KGYLAVVYGP ELRRFIPTN
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

..101 FLSHSLFKVL LEKAEEEYGF DHSGALTIPC EVETFKYLLK CIENHPKDDT
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

..151 SAEDPVETEE
..... 0000000000

```

B

```

....1 MGKNNKIGSV VRIQMLKQW QKKAHIGSSN NDPVSDVPPG HVAVSVGENR
..... 0000001234 4444444444 4444443210 0000001222 3467899999

...51 RRYVYRAKHL NHPIFRRLLA EAEVEYGFAN VGPLAIPCDE SLFEDIIAIV
..... 9999998777 6432100000 0000000000 0000000000 0000000000

..101 TRCESSSSSG RGNPPAATLE DLRRCSHVGL AKNNVESRPL LPGIAEKSVC
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

```

C

```

....1 MDENNAAKLT GIRQIVRLKE ILQKWQTVTI GPKSEVPPLA AGKQAVAMIS
..... 0011123445 6789999999 9999876544 3211000000 0000000000

...51 PAINKRLLDV KNGDSDEETC QSPEPPDPVP KGNLAVVYGP ELRRFIPTN
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

..101 YLSHSLFKVL LEKAEEEFGF DQSGALTIPC EVETFKYLLK CMENNLKDLH
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

..151 PDDNSGKPPK DQLLPDHTM NSNPGGQPRL NPGTGLKSKP
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

```

図4. Calmodulin Target DatabaseによるCaM結合部位の予測

Calmodulin Target DatabaseのBinding Site Searchを用いて、SAUR39, SAUR49およびSAUR70のCaM結合部位の予測を行った。

(A)はSAUR39、(B)はSAUR49、(C)はSAUR70の結果を示した。

予測されるCaM結合部位は、スコア値の高い配列が連続する部位で示される。



図5. SAUR39、SAUR49およびSAUR70の2次構造の予測

Jpred4を用いて、SAUR39、SAUR49およびSAUR70の2次構造の予測を行った。Hはα-ヘリックス構造を示し、Eはβ-シート構造を示す。
(A)はSAUR39、(B)はSAUR49、(C)はSAUR70の結果を示した。

A

SAUR70	TGIRQIVRLKEILQKWQTVTIGPKS
	.
SAUR39	TGIKQIVRLKEILQKWQTVTIGSKS
SAUR49	NKIGSVVRIRQMLKQWQKKAHIGSS
	. . .
ZmSAUR1	NKIRDIVRLQQLLKKWKKLATVTPS

B

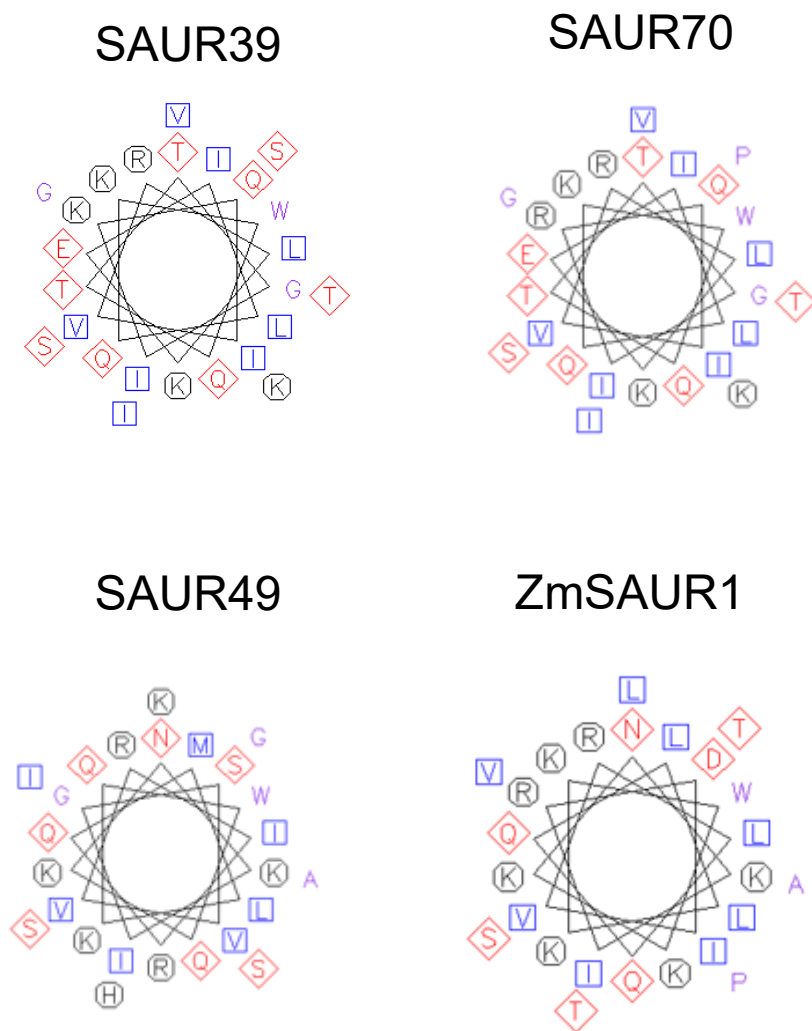


図6. SAUR39、SAUR49およびSAUR70のCaM結合部位の構造

(A) CaM結合部位のアミノ酸配列の比較結果。ZmSAUR1は、CaMとの結合が証明されているトウモロコシのSAURである。

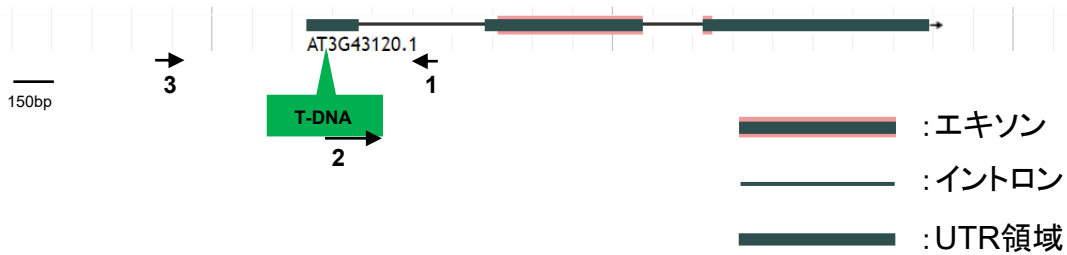
(B) CaM結合部位の α -ヘリックス構造の模式図

青色は疎水性のアミノ酸残基、黒色は塩基性のアミノ酸残基を示した。

表1.変異体系統

Gene ID	変異体名	SALK番号	T-DNA挿入部位
At3g43120	<i>saur39-1</i>	SALK_063426	5'UTR
At3g43120	<i>saur39-2</i>	SALK_204538	5'UTR
At3g43120	<i>saur39-3</i>	SALK_133652	3'UTR
At4g34750	<i>saur49</i>	SALK_134586	promoter
At5g20810	<i>saur70</i>	SALK_023753	exon

A



B

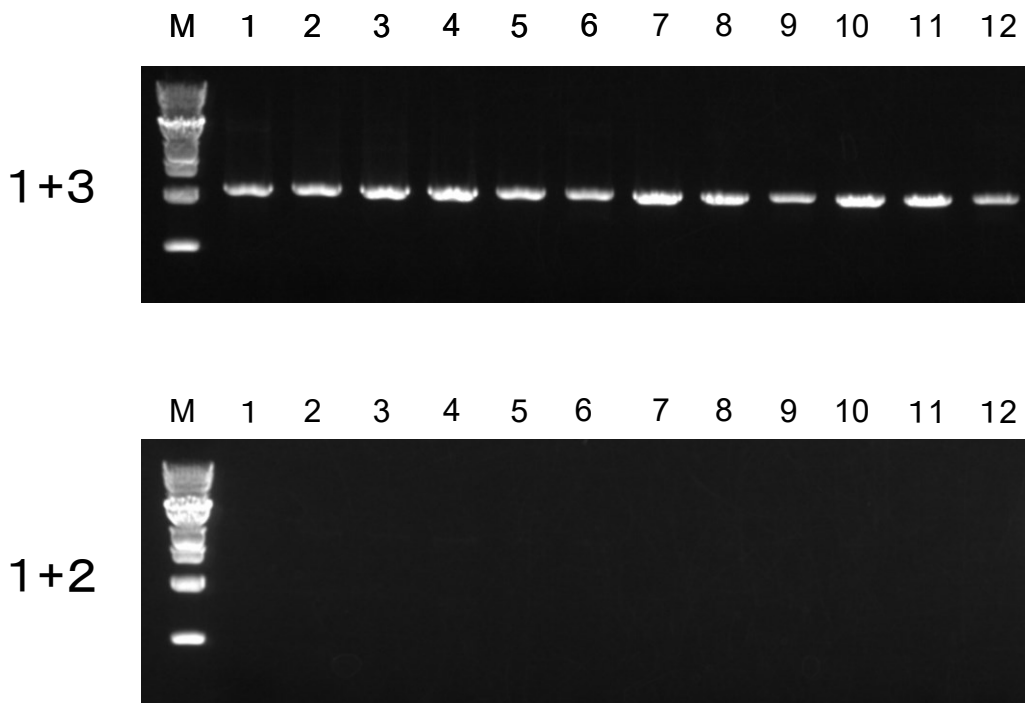


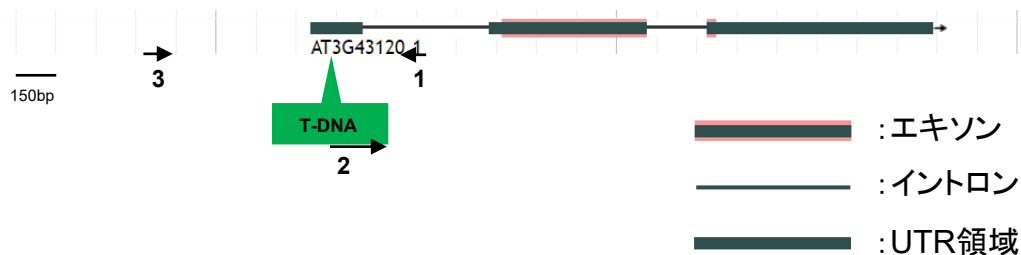
図7. *saur39-1*の T-DNA挿入の有無と遺伝子型の判定

(A) T-DNA挿入部位と遺伝子型判定に用いたプライマーのアニールサイト

(B) 電気泳動によるバンドの有無の確認

Primer1とPrimer2 (1+2)、Primer1とPrimer3 (1+3)の2つのプライマーセットを用いたPCRにより、T-DNA挿入の有無と遺伝子型を判定した。

A



B

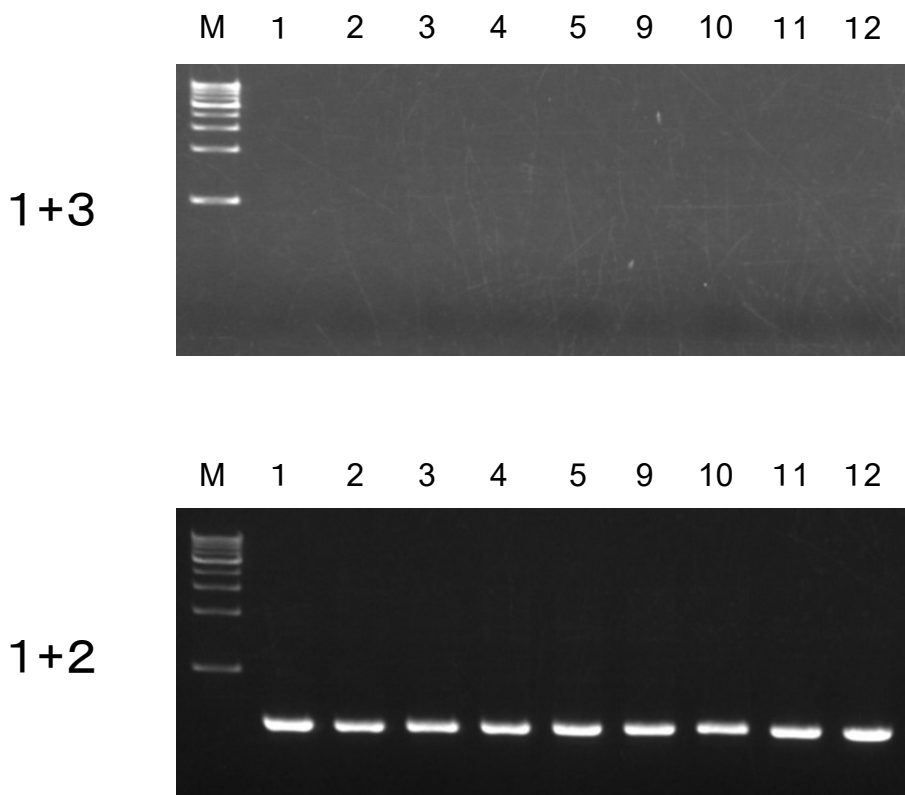


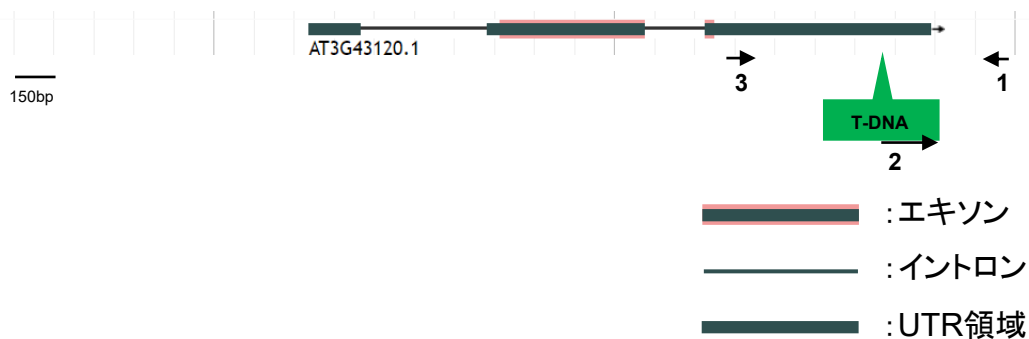
図8. *saur39-2*の T-DNA挿入の有無と遺伝子型の判定

(A) T-DNA挿入部位と遺伝子型判定に用いたプライマーのアニールサイト

(B) 電気泳動によるバンドの有無の確認

Primer1とPrimer2 (1+2)、Primer1とPrimer3 (1+3)の2つのプライマーセットを用いたPCRにより、T-DNA挿入の有無と遺伝子型を判定した。

A



B

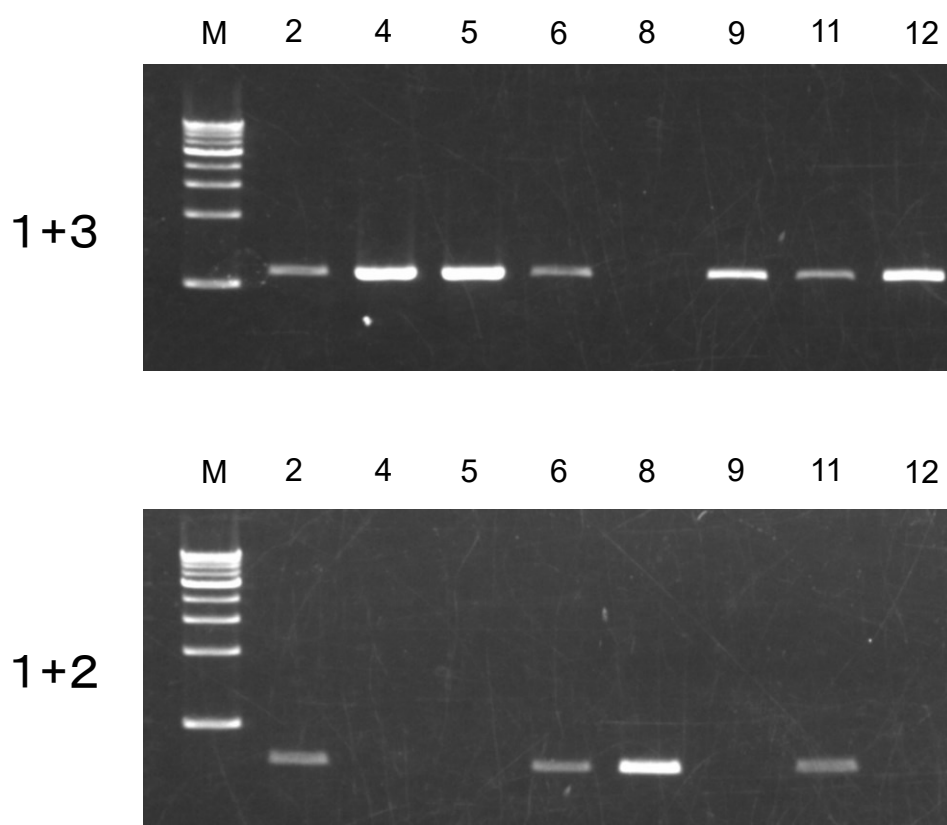


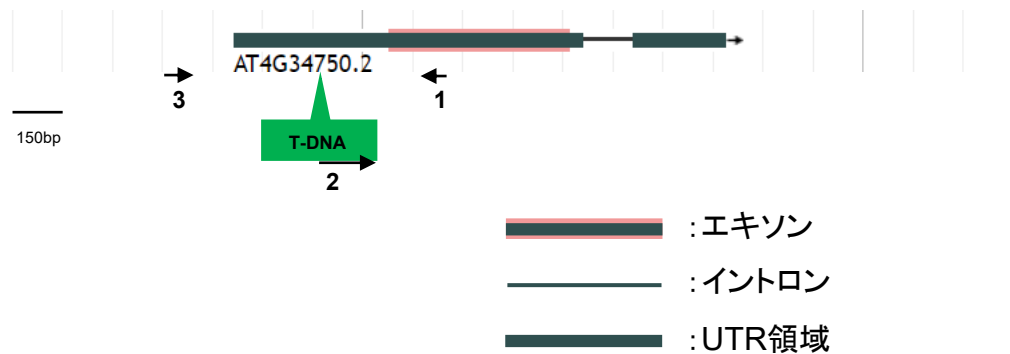
図9. *saur39-3*の T-DNA挿入の有無と遺伝子型の判定

(A) T-DNA挿入部位と遺伝子型判定に用いたプライマーのアニールサイト

(B) 電気泳動によるバンドの有無の確認

Primer1とPrimer2 (1+2)、Primer1とPrimer3 (1+3)の2つのプライマーセットを用いたPCRによりT-DNA挿入の有無と遺伝子型を判定した。

A



B

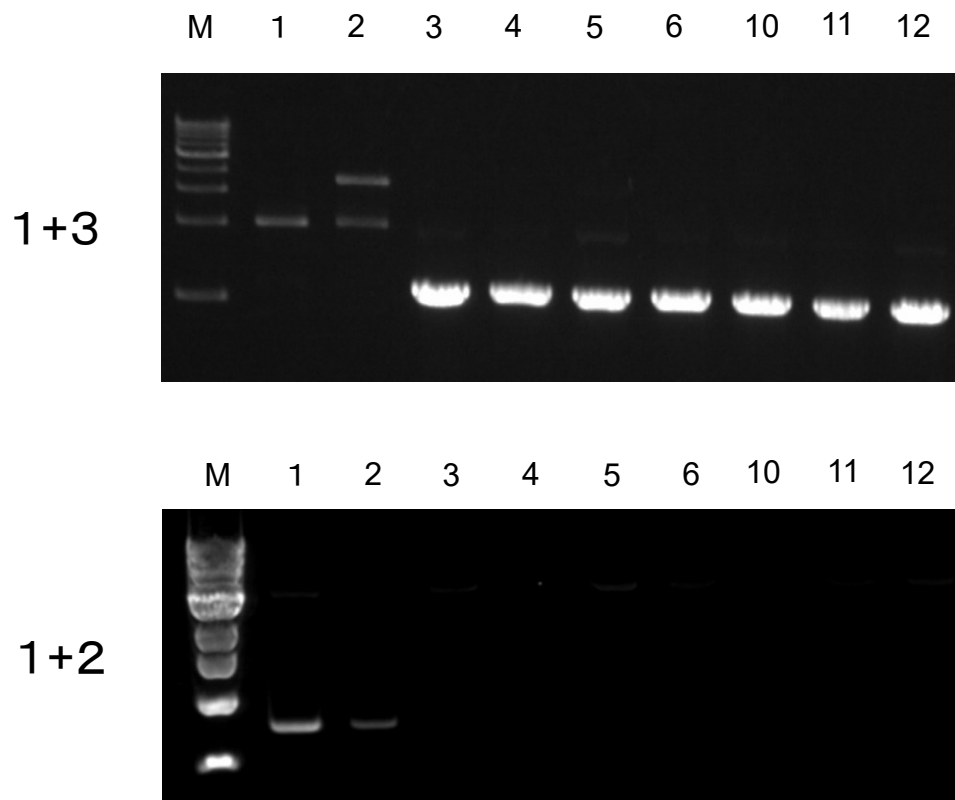


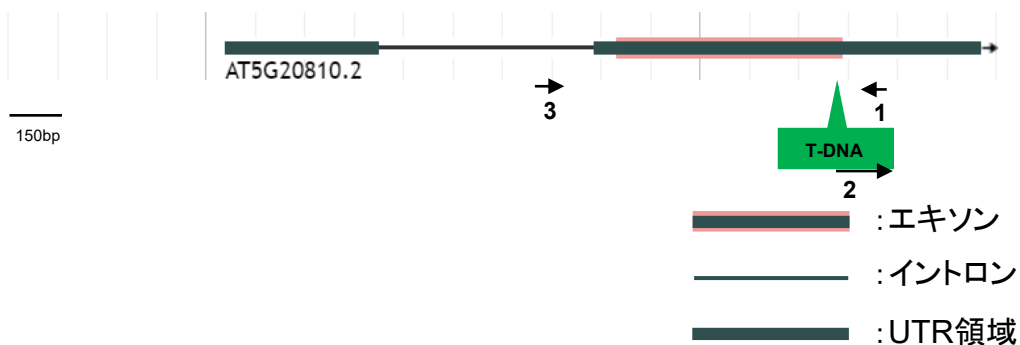
図10. *saur49*の T-DNA挿入の有無と遺伝子型の判定

(A) T-DNA挿入部位と遺伝子型判定に用いたプライマーのアニールサイト

(B) 電気泳動によるバンドの有無の確認

Primer1とPrimer2 (1+2)、Primer1とPrimer3 (1+3)の2つのプライマーセットを用いたPCRにより、T-DNA挿入の有無と遺伝子型を判定した。

A



B

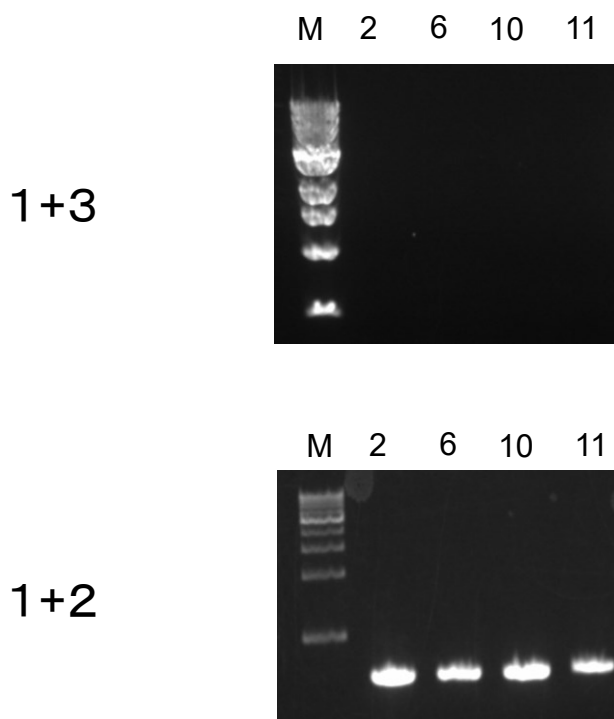


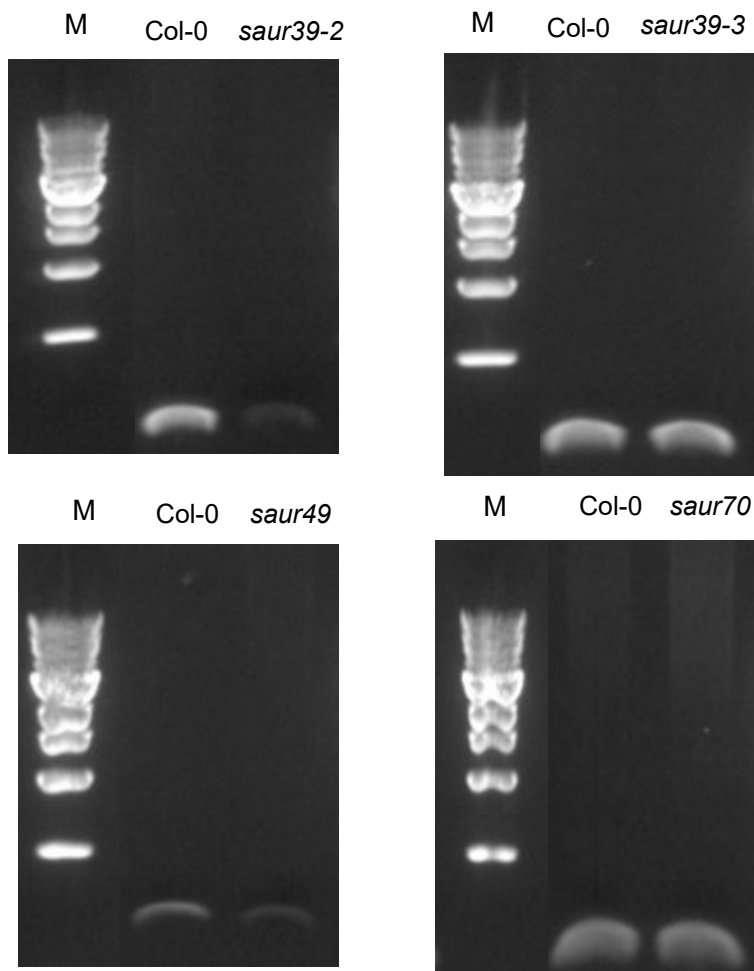
図11. *saur70*の T-DNA挿入の有無と遺伝子型の判定

(A) T-DNA挿入部位と遺伝子型判定に用いたプライマーのアニールサイト

(B) 電気泳動によるバンドの有無の確認

Primer1とPrimer2 (1+2)、Primer1とPrimer3 (1+3)の2つのプライマーセットを用いたPCRにより、T-DNA挿入の有無と遺伝子型を判定した。

A



B

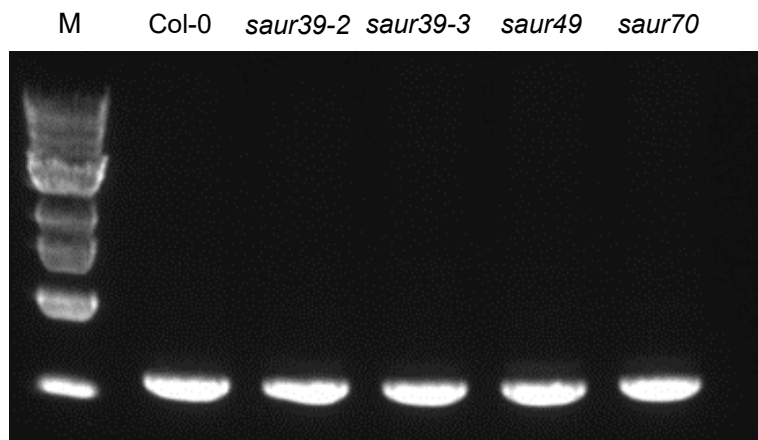


図12. RT-PCRによる各変異体でのSAUR遺伝子の発現変化の解析

野生型および各変異体のステージ13の葎のRNAを用いた、逆転写(RT)-PCRによって各遺伝子の発現レベルを調査した。

(A) 野生型と各saur変異体におけるSAUR遺伝子の発現量の比較

(B) コントロールとして用いたActin1による発現量の比較

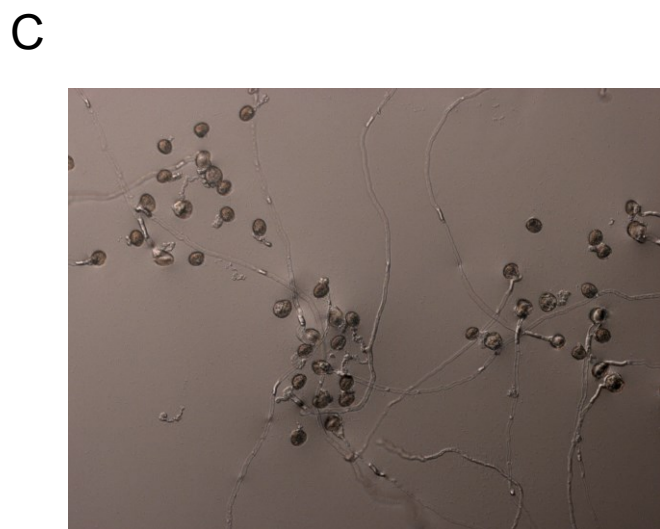
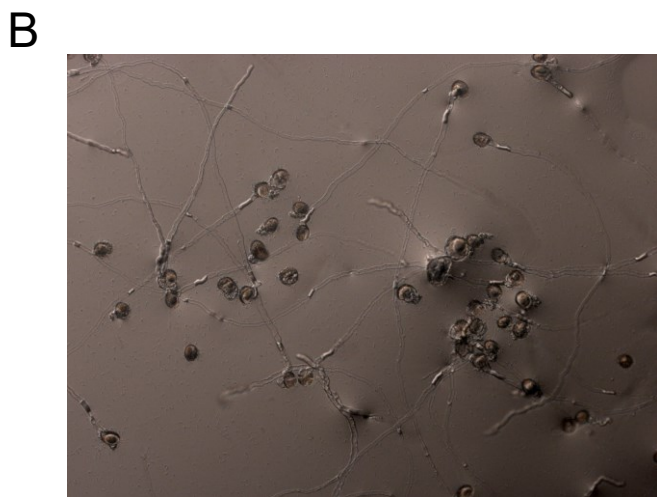


図13. *in vitro*培地における花粉管発芽の表現型
 PGM培地で発芽処理した培養24時間後の花粉を写真撮影した。
 (A) Col-0、(B) *saur39-2*、(C) *saur49*、(D) *saur70*

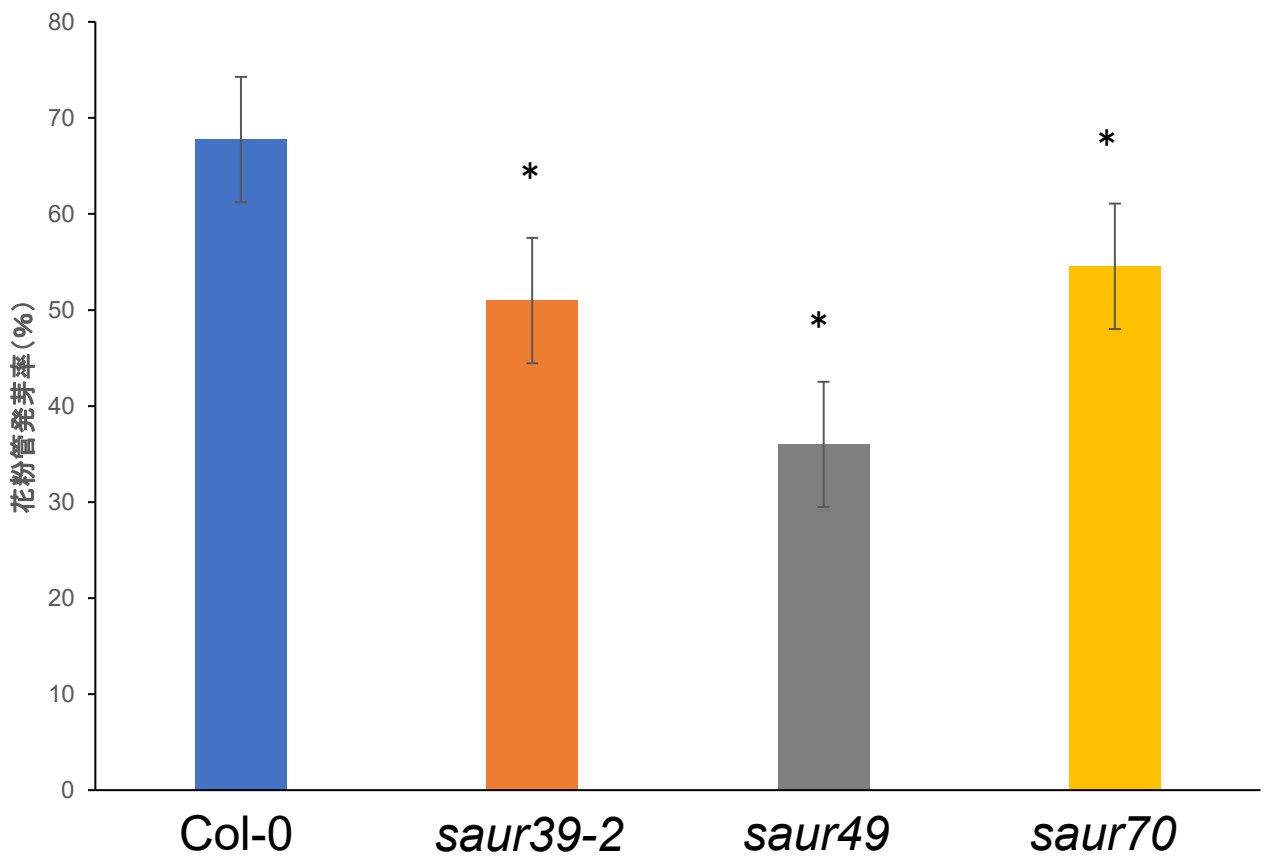


図14. *in vitro*培地における花粉管発芽率

PGM培地で発芽処理した培養後24時間後のCol-0、*saur39-2*、*saur49*および*saur70*の花粉管発芽率を比較した。調査した花粉数は、それぞれn=493, 202, 150, 110で行った。エラーバーで標準誤差を示した。* $P < 0.05$

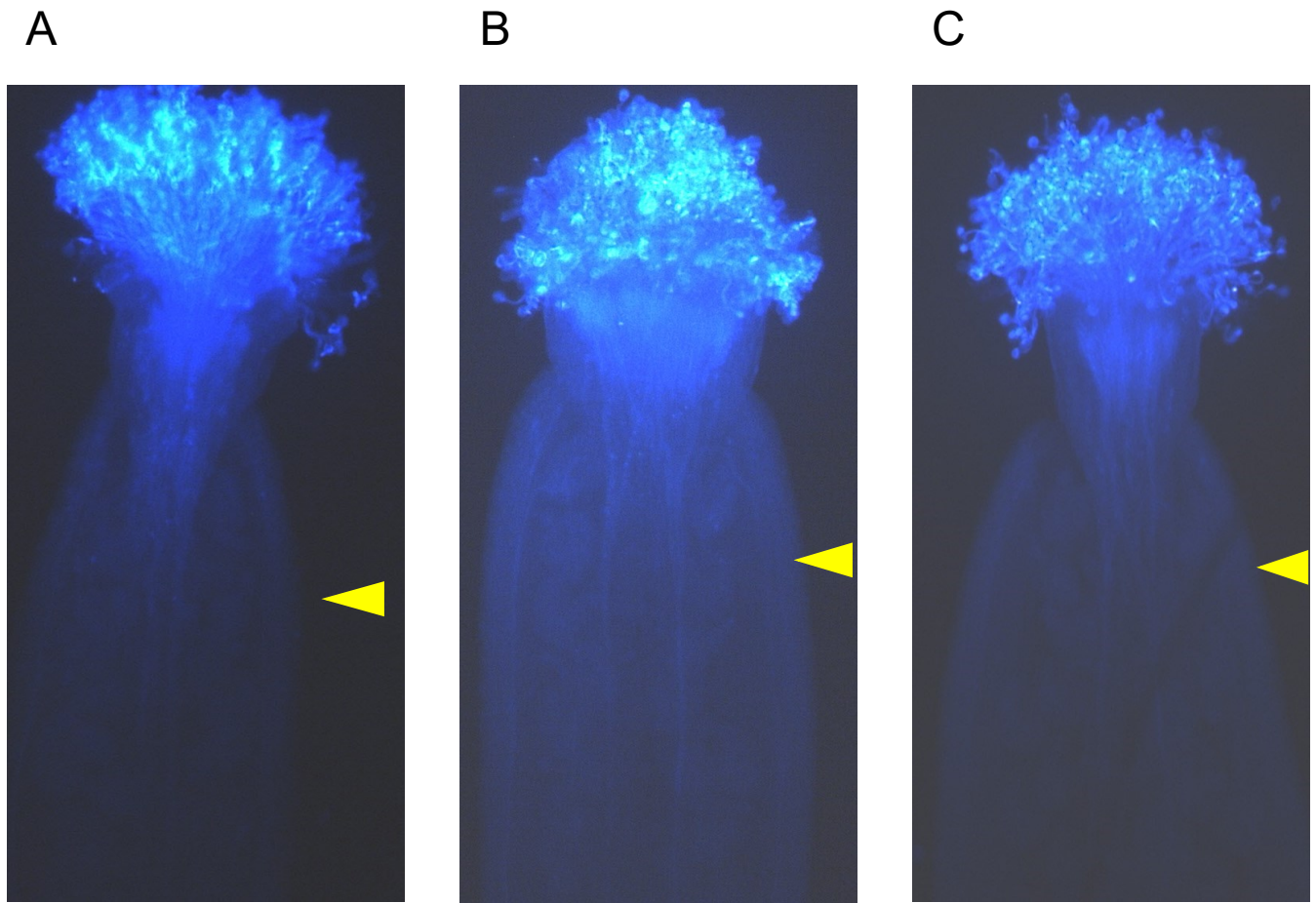


図15. stage14の雌ずいにおける花粉管伸長

受粉後3時間の花粉管伸長の表現型をアニリンブルー染色で解析した。矢じりで、花粉管の到達位置を示した。(A) Col-0、(B) *saur39-2*、(C) *saur49*

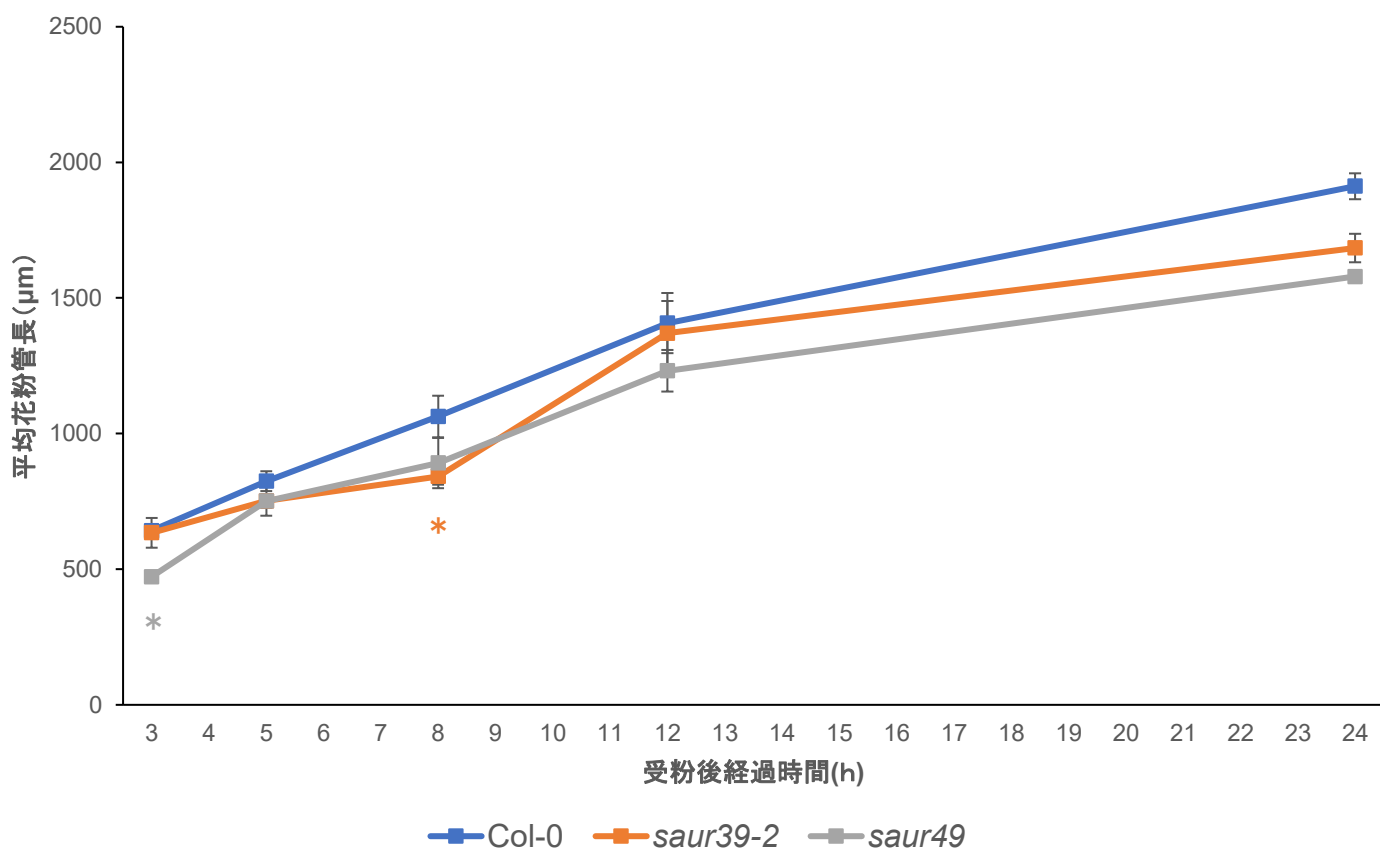


図16. 受粉から3, 5, 8, 12, 24時間後のstage14の雌ずいにおける花粉管長

Col-0、*saur39-2*、*saur49*の受粉後3, 5, 8, 12, 24時間後の花粉管長を測定した。調査した雌ずいの本数はCol-0が時間ごとでn=3, 4, 5, 4, 3で行った。*saur39-2*はn=4, 4, 4, 4, 4で行った。*saur49*はn=4, 3, 3, 4, 2で行った。エラーバーで標準誤差を示した。* $P < 0.05$

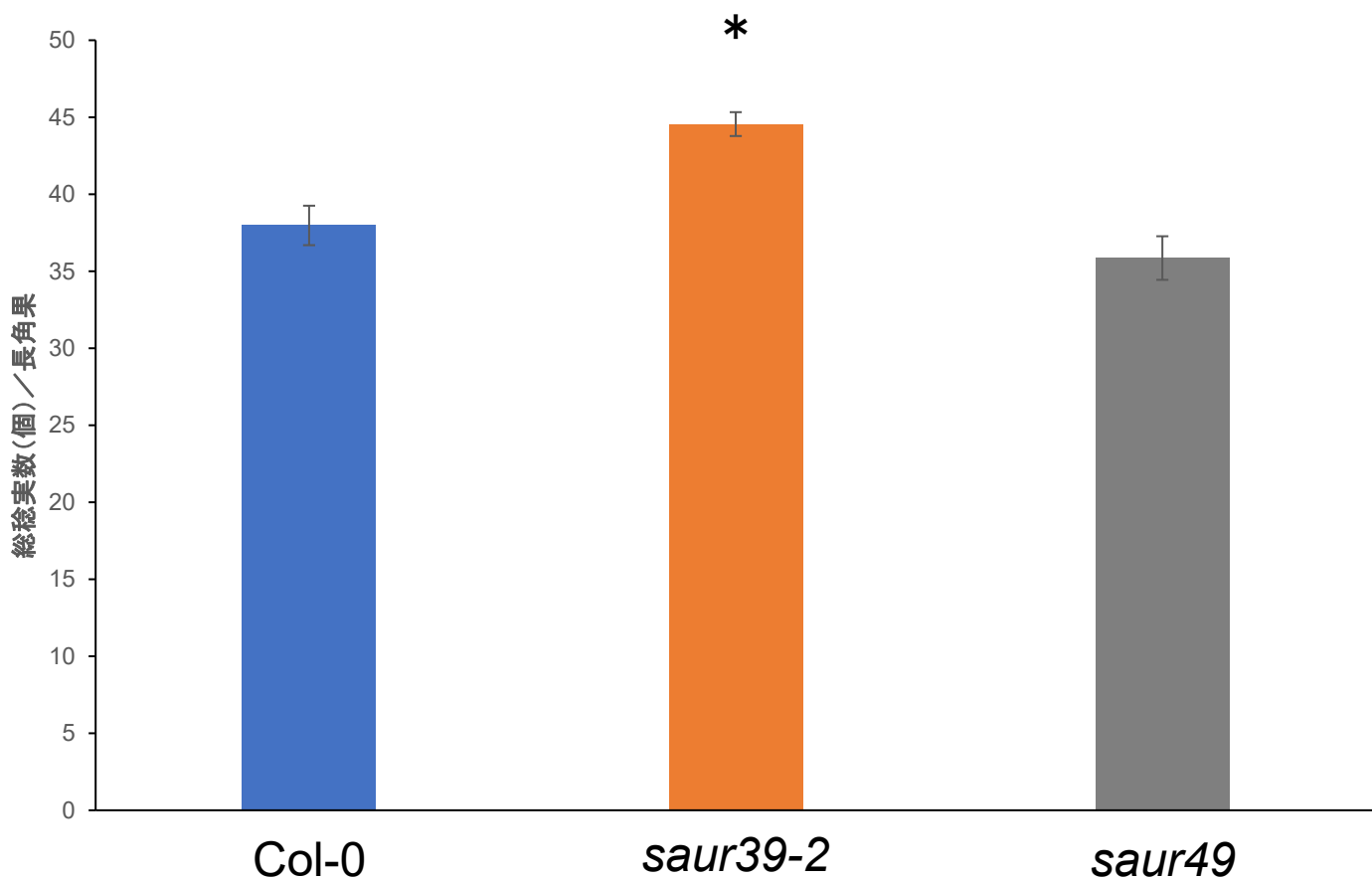


図17. 自家受粉における平均種子結実数

Col-0、*saur39-2*、*saur49*の長角果あたりの種子数を測定した。調査した長角果数は、それぞれn=39, 56, 28で行った。エラーバーで標準誤差を示した。* $P < 0.05$

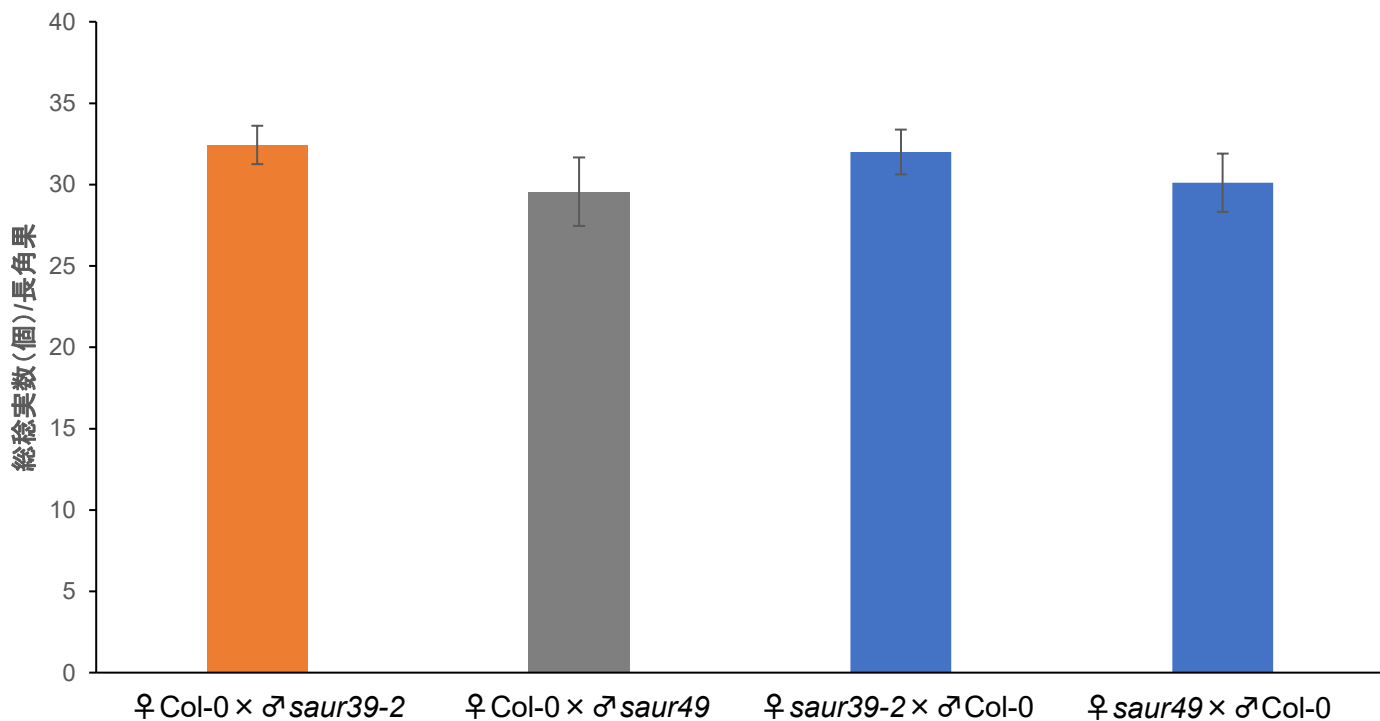


図18. 他家受粉における平均稔実数

♀ Col-0 × ♂ *saur39-2*、♀ Col-0 × ♂ *saur49*、♀ *saur39-2* × ♂ Col-0、および ♀ *saur49* × ♂ Col-0の長角果あたりの種子数を測定した。調査した長角果数は、それぞれ $n=23, 23, 24, 18$ で行った。エラーバーで標準誤差を示した。* $P < 0.05$

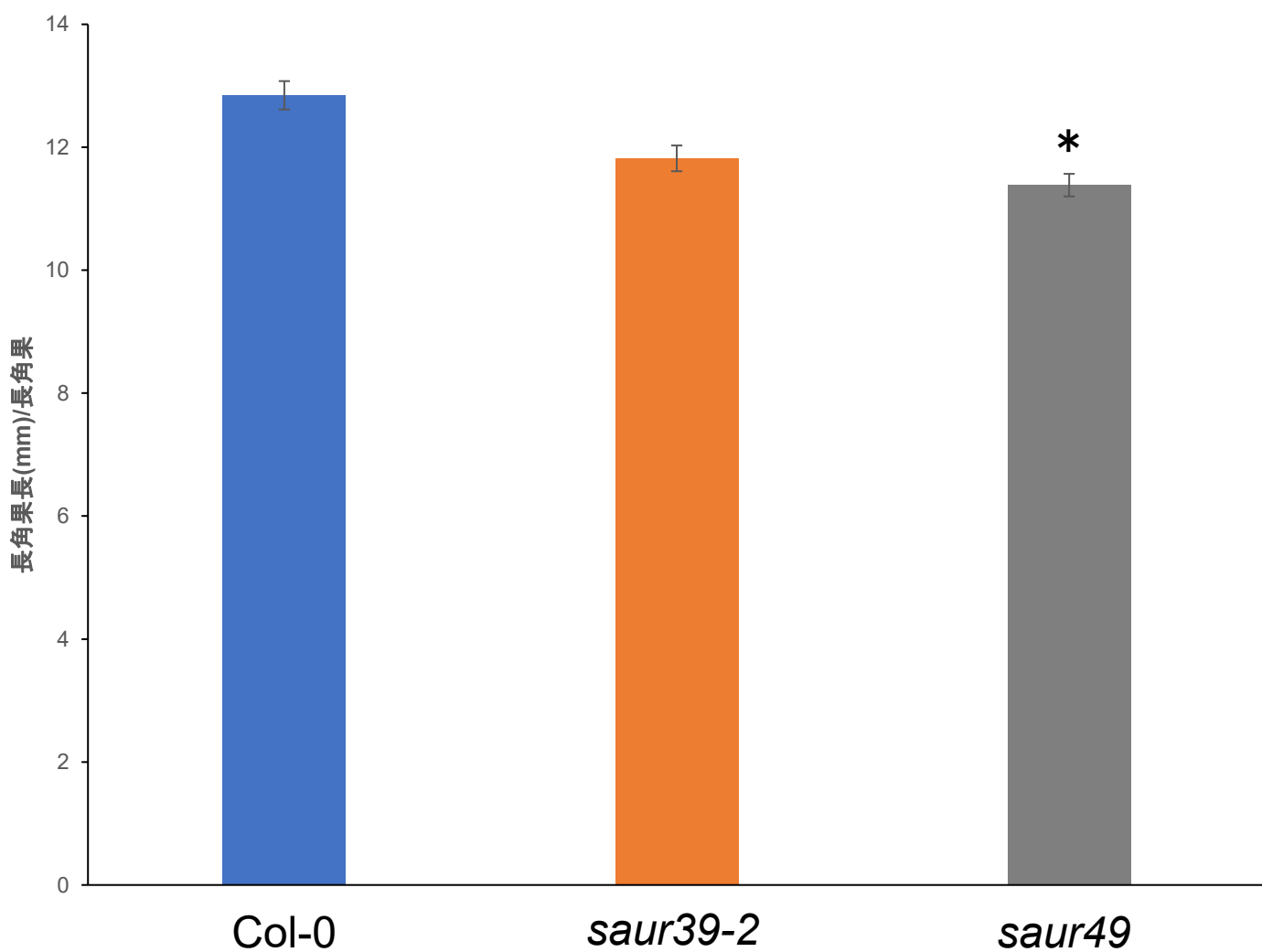


図19. 自家受粉における平均長角果長

Col-0、*saur39-2*、*saur49*の長角果あたりの長角果長を測定した。調査した長角果数は、それぞれn=39, 56, 28で行った。エラーバーで標準誤差を示した。

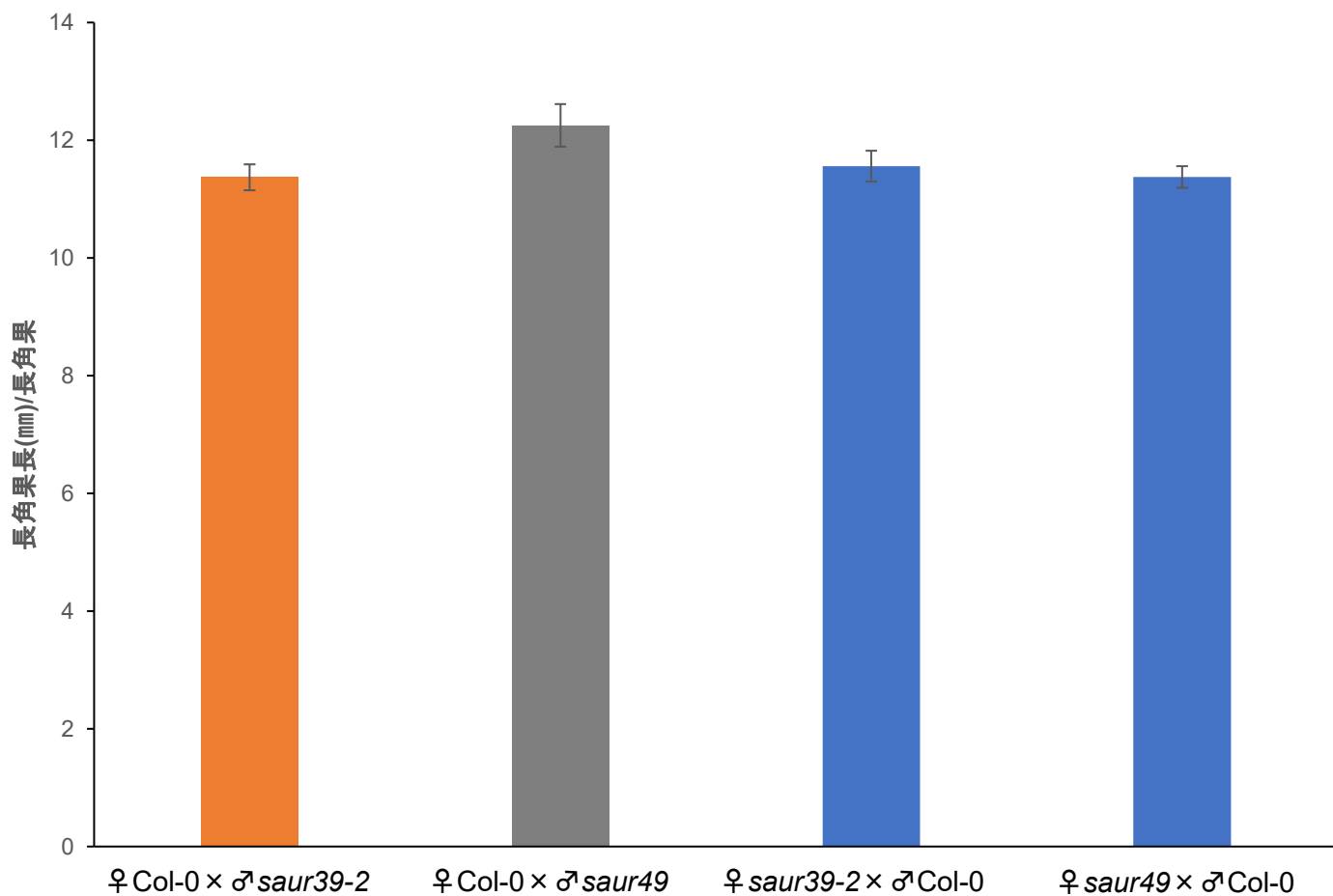


図20. 他家受粉における平均長角果長

♀ Col-0 × ♂ *saur39-2*、♀ Col-0 × ♂ *saur49*、♀ *saur39-2* × ♂ Col-0 および ♀ *saur49* × ♂ Col-0 の長角果あたりの長角果長を測定した。調査した長角果数は、それぞれ $n=23$, 23 , 24 , 18 で行った。エラーバーで標準誤差を示した。

表2. 本実験で用いたPCRプライマー

primer	sequence(5'→3')
SAUR39-1 primer1	ACCTTGGTTTTTAATTCTGGTTTTTC
SAUR39-1 primer3	CATCTTTATTTGGTTCCAAATATGC
SAUR39-2 primer1	AGACAAAACAACCTTGATTGAACATG
SAUR39-2 primer3	TGATGACCTTTAGTCCTTTATCAGC
SAUR39-3 primer1	ATTGAGTTGATCGATGAACCTAGAG
SAUR39-3 primer3	GAAGATGGTTTCCTGAGTATTGATG
SAUR49 primer1	GAGTATCACAATCATCCTCCAACTC
SAUR49 primer3	TTTATAAGGTATCCCCTTTTAACCG
SAUR70 primer1	CTGATTTTACAATTACACCCCAAAG
SAUR70 primer3	TTTCATTTATTTTGATGCAACTGAG
primer2	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
RT-PCR SAUR39 right primer	AAGAATGGCTAAGAAAGTTTGTGGG
RT-PCR SAUR39 left primer	CACAGCTATCATTTACCGGTTATC
RT-PCR SAUR49 right primer	CCGATCTTATTGTTCTTCCCCATTG
RT-PCR SAUR49 left primer	CTTTAAATACCGTAACGCTAAATTC
RT-PCR SAUR70 right primer	TTTCTGCAAATCTCCTTAAGCCTG
RT-PCR SAUR70 left primer	CTTCAATTCGTTTTCTCTTCAGCT
RT-PCR ACTIN1 right primer	GCACCTAGAGCTGTGTTTCCTAGT
RT-PCR ACTIN1 left primer	GCTCGTAGTCAAGAGCAATGTAGC