

植物多精拒否の分子機構の解明

Study on the Molecular Mechanism of Blocking of Plant Polyspermy

(日本植物学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 東山 哲也 Nagoya University Tetsuya HIGASHIYAMA

The concept of a pollen tube attractant was proposed in the nineteenth century. Since then, for more than 140 years, plant biologists tried to identify a pollen tube attractant(s) derived from the ovule. Identification of the attractant is critical to reveal the mechanism of blocking polyspermy at the step of pollen tube guidance. We had previously shown that the synergid cell on the side of the egg cell emits some diffusible, species-specific attractant, by using an in vitro system of a unique plant *Torenia* having a protruding embryo sac. In this study, we investigated genes expressed in the synergid cell of *Torenia*, by collecting isolated synergid cells. We found that cysteine-rich polypeptides (CRPs) were abundantly expressed in the synergid cell. Among the CRPs, at least two defensin-like polypeptides, named as LUREs, showed strong activity to attract pollen tubes. By developing a laser-assisted thermal-expansion microinjector, LUREs were finally identified as true attractants derived from the synergid cell (Okuda et al., Nature, 2009). Moreover, we could visualize LUREs by immune-staining and showed that LUREs exist even several hours after the fertilization. Our finding suggests that some active mechanism exists to block guidance of pollen tubes to the fertilized ovule.

研究目的

花のめしべの中で、複数の花粉から伸びだした花粉管は、競争を伴いながら卵細胞のある部分（胚嚢；雌性配偶体）に向かう。しかし正常な受精において、胚嚢に到達する花粉管は、必ず1本である。めしべの中に複数の胚嚢がある場合、花粉管はまるで電子回路のようにそれぞれに1本ずつ分配される。このように、植物では花粉管誘導の段階から花粉管の伸長パターンを制御し、多精を防ぐ仕組みがあると考えられる。また、植物では兄弟関係にある2つの精細胞が同時に花粉管から胚嚢に放出される。その一方は卵細胞と受精するが、もう一方も隣にある中央細胞と受精して胚乳（栄養組織）を形成する。これを重複受精という。なぜ重複受精で2つの精細胞とも同じ相手と受精することがないのか、多精拒否との関連が長年議論されてきた。しかし、めしべ組織の中で進行する、動的で複雑な多精拒否を研究することは、これまで難しかった。本研究では、申請者が世界に先駆けて開発した in vitro 重複受精系や重複受精のライブイメージング技術、また140年の謎とされる花粉管誘引物質の同定を基盤に、植物多精拒否の分子機構を解明することを目指す。

研究経過

(1) 花粉管誘引物質の同定

花粉管ガイダンス段階における多精拒否の仕組みを明らかにするために、花粉管誘引物質の同定を目指した。受精過程におけるガイダンスシグナルの動的な変化を解明することが、多精拒否機構を解析するために必要不可欠である。これまでに、胚嚢が突出するユニークな植物であるトレニアに着目することで、胚嚢へのガイダンスを *in vitro* で再現することに成功していた。さらに、胚嚢への誘引シグナルは、卵細胞のとなりに2つある助細胞に由来する、種特異性を示す拡散性因子であることを突き止めていた。そこで、分子進化の容易なタンパク質性の因子から解析することにした。

トレニアの胚嚢を細胞壁分解酵素で処理することで、胚珠組織から遊離させた。マイクロマニピュレーターを用いて顕微鏡下で遊離した胚嚢を回収し、さらに細胞の形態に応じて、卵細胞、助細胞、中央細胞の各細胞に選り分けた。そして助細胞 25 個から cDNA ライブラリーを作製し、助細胞で発現する遺伝子を解析することで、候補タンパク質を得ることを試みた。

ランダムに 2,000 クローンを選び、遺伝子発現解析 (Expressed Sequence Tag (EST) 解析) を行い、最終的に 256 のコンティグを得た。興味深いことに、配列について詳しく見てみると、システインに富み、分泌性と予想される多くのペプチド (Cysteine-rich polypeptide (CRP)) が含まれていることが分かった。256 のコンティグの中に、16 のペプチドが見出され、リード数の多い順に TfCRP1~16 と名付けた (*Torenia fournieri* cysteine-rich polypeptide1~16)。これらは、シグナルペプチドの部分を除いて、数十アミノ酸からなるペプチドと予想される。

CRP の中でも特にリード数の高かった TfCRP1~3 の 3 つの CRP について解析を進めたところ、*TfCRP1* および *TfCRP3* は助細胞だけで発現していることが示された。CRP は保存されたシステインの数や配置などにより分類されるが、TfCRP1 および TfCRP3 はシステインを 6 つ持ち、比較的類似した構造を示すディフェンシンに類似のペプチドであった。さらに抗体を作製して解析を進めたところ、TfCRP1 および TfCRP3 とともに、助細胞の線形装置と呼ばれる細胞壁構造に向かって極性分泌されていることが明らかとなった (Figure 1)。線形装置とは助細胞の基部に見られる構造で、分泌、吸収、あるいは花粉管の進入からの保護との関わり推察されており、花粉管はこの部位に誘引される。



Figure 1. Immuno-staining of TfCRP3 (LURE2) in a whole *Torenia* ovule. The micropylar end of the protruding embryo sac, to which a pollen tube is attracted, is stained. Scale bar is 20 μ m.

TfCRP1 および TfCRP3 が助細胞の分泌する誘引物質である可能性があると考え、次に大腸菌で発現させたペプチド TfCRP1 および TfCRP3 に誘引活性があるかどうか調べた。その結果、これらのペプチドは、強い誘引活性を示すことが明らかとなった (Figure 2)。

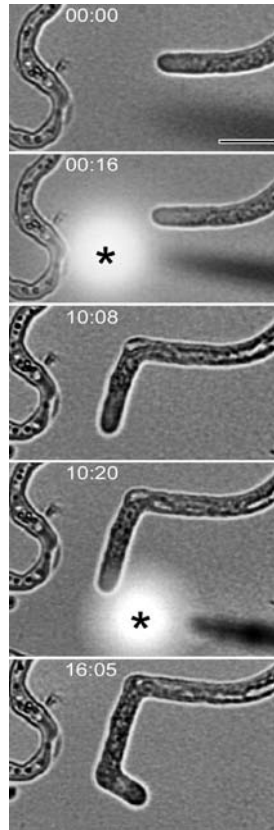


Figure 2. Pollen tube attraction to the refolded recombinant peptide of TfCRP3 (LURE2). Reproduced from Okuda et al., 2009, Nature, after modification. Asterisks indicate injection of the peptide. Time after the start of observation is indicated as mm:ss and the scale bar indicates 20 μ m.

次に、定量的な解析を進めるために、ゼラチンビーズにペプチドを埋め込んで誘引能を検定するアッセイ系を開発して解析を進めた。その結果、TfCRP1 および TfCRP3 とともに、濃度に依存した誘引活性が見られることが明らかとなった。至適濃度ではそれぞれ 60%前後の活性を示した。これは、助細胞を含む胚嚢そのものを置いたときの花粉管誘引率とほぼ同等である。また、こうした誘引活性は、「培地上で発芽した花粉管を誘引しない」、「近縁種であるアゼトウガラシの花粉管を誘引しない」など、トレニア助細胞の誘引活性の特徴と一致した。そこで TfCRP1 および TfCRP3 は真の誘引活性を示すものとみなし、それぞれ LURE1 および LURE2 と名付けた。LURE とは釣りのルアーのように、引き寄せるもの、という意味である。

さらに、LURE が確かに助細胞による花粉管の誘引に関わるか、発現阻害実験を試みた。独自に開発した Laser-assisted Thermal-expansion Microinjection 法 (LTM 法) によりモルフォリノンチセンスオリゴをインジェクションし、誘引の有無について観察した。その結果、LURE1 および

*LURE2*のアンチセンスオリゴ特異的に、花粉管誘引率の有意な低下が見られた。これにより、我々は *LURE* が実際に花粉管誘引に関わる物質であると結論した。上記の結果と合わせ、*LURE* が真の花粉管誘引物質であるとする論文を *Nature* 誌に発表した (Okuda et al. 2009)。

この発見を基盤に、受精に伴い *LURE* がどのように変化するか詳細な解析を進めたところ、受精後 6~7 時間経過したのちにも、*LURE* が抗体により胚嚢先端に検出されることが明らかとなった。また、一方、研究計画に従ってライブイメージングにより受精段階における多精拒否の機構についても解析を進めた。遺伝学的に、卵細胞ではブロックが働くことが示唆されている。しかしイメージングの結果からは、卵細胞の受精が常に先に起こるような結果は得られなかった。花粉管が 1 本だけ到達し 2 つの精細胞を放出する通常の場合では、多精拒否とは異なる機構で選別的な受精が達成されている可能性が示唆された。

考察

140 年に渡って探し求められてきた花粉管の誘引物質が同定されたことから、本研究は *Nature* 誌の表紙を飾る成果となった (Okuda et al 2009)。*LURE* はディフェンシンに類似のタンパク質であった。ディフェンシンは自然免疫系で働くペプチドであることから、誘引物質は、胚嚢への入口に位置する助細胞の自然免疫系から派生したのかも知れない。アブラナの自家不和合性において花粉側の決定因子として働く *SP11/SCR* も、ディフェンシンに類似のタンパク質である (Higashiyama 2010)。花粉と雌蕊のコミュニケーションにおいて、はじめと終わりの段階で、しかも雄と雌が入れかわる形で類似の物質を利用していることは興味深い。一方で、*LURE* と *SP11/SCR* は、ともにディフェンシン類似のペプチドではあるものの、システインの配置や数の違いから、別のサブグループに属する。また、作用メカニズムとしても、*LURE* は複数で働くのに対し、*SP11/SCR* は単一のペプチドで厳密な自他認識を行う。*LURE* と同様な構造を示す *TfCRP* は他に 4 種あり、誘引物質はまだ他にも存在する可能性がある。さらに、*SP11/SCR* とは異なり、*LURE* のはたらきには、濃度勾配が重要である可能性が示唆されている。*LURE* の際立った発現の高さは、より遠距離まで濃度勾配を維持するために重要なのかも知れない。

興味深いことに、*LURE* は、受精後のまさに多精拒否が進行している時に、依然として胚嚢先端に高いレベルで検出された。このことは、*LURE* の誘引活性を無効にする何らかの仕組みが存在することを示唆している。*LURE* 自体が限定的な変化を伴う可能性や反発物質の存在などが示唆される。今後は、受精後に存在する *LURE* が誘引活性をもつか、あるいは受精後の胚嚢に反発物質の活性が見られるかといった解析の進展が期待される。本研究により、植物多精拒否機構の研究に対して、重要な基盤となる成果を得ることができたと言える。

研究発表

口頭発表

1. Tetsuya Higashiyama; “Pollen tube attractants derived from the synergid cell”, *Frontiers of Sexual Plant Reproduction III* (Tucson, 2008)
2. Yuki Hamamura., Chieko Saito., Masahiro M.Knaoka.,Narie Sasaki., Akihiko Nakano., Tetsuya Higashiyama; “Real time imaging of double fertilization in *Arabidopsis thaliana*”,

Frontiers of Sexual Plant Reproduction III (Tucson, 2008)

3. 椎名恵子、奥田哲弘、金岡雅浩、佐々木成江、東山哲也 ; 「花粉管誘引物質 LUREs から探る植物多精拒否機構」、日本植物生理学会 (名古屋、2009)
4. 椎名恵子、奥田哲弘、金岡雅浩、佐々木成江、東山哲也 ; 「花粉管誘引物質 LUREs から解き明かす植物多精拒否機構」、日本植物学会 (山形、2009)
5. Keiko Shiina, Satohiro Okuda, Masahiro M. Kanaoka, Narie Sasaki, Tetsuya Higashiyama; “Relation between blocking polyspermy and pollen tube attractants”, International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction (Nara, 2010)

誌上発表

1. Satohiro Okuda, Hiroki Tsutsui, Keiko Shiina, Stefanie Sprunck, Hidenori Takeuchi, Ryoko Yui, Ryuushiro D. Kasahara, Yuki Hamamura, Akane Mizukami, Daichi Susaki, Nao Kawano, Takashi Sakakibara, Syoko Namiki, Kie Itoh, Kurataka Otsuka, Motomichi Matsuzaki, Hisayoshi Nozaki, Tsuneyoshi Kuroiwa, Akihiko Nakano, Masahiro M. Kanaoka, Thomas Dresselhaus, Narie Sasaki, Tetsuya Higashiyama; “Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells”, *Nature* 458: 357-361 (2009).
2. Tetsuya Higashiyama; “Peptide signaling in pollen-pistil interactions”, *Plant and Cell Physiology* 51: 177-189 (2010).